



UNIVERSITÀ DI PISA

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E
NATURALI

CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN SCIENZE
FISIOPATOLOGICHE GENERALI

TESI DI LAUREA

L'APPRENDIMENTO A LUNGO TERMINE
NELLA SANGUISUGA *HIRUDO*
MEDICINALIS

Candidata

Ilaria Aloe

Relatori

Dott. Rossana Scuri

Prof. Marcello brunelli

Anno Accademico 2009-2010

**Alla mia Mamma e Papà
dedico, non questa tesi,
ma gli anni più belli della
mia vita**

RIASSUNTO

Nel sistema nervoso gangliare degli invertebrati è possibile identificare le cellule che costituiscono le reti neurali alla base degli atti comportamentali e studiare a livello cellulare i cambiamenti plastici che possono intervenire durante gli eventi di apprendimento e memoria. In particolare la sanguisuga *H. medicinalis* si è rivelata un ottimo modello per lo studio dei meccanismi cellulari e molecolari alla base dell'apprendimento.

In questa tesi si è cercato di individuare in *H. medicinalis*, mediante esperimenti di tipo comportamentale e biologico-molecolare, i meccanismi alla base dell'abitudine e della sensitizzazione a lungo termine (LT).

È stato preso in esame l'atto comportamentale dell'induzione al nuoto, ovvero l'induzione di un ciclo di nuoto in risposta ad un lieve stimolo elettrico (stimolo test) applicato sulla cute della porzione caudale dell'animale che aveva precedentemente subito la disconnessione microchirurgica del primo ganglio segmentale dal ganglio cefalico. Si osserva abitudine a breve termine (BT) quando durante una sessione di addestramento, all'applicazione ripetuta per 15 volte dello stimolo test, ad intervalli costanti di 1 minuto, si ha un progressivo aumento della latenza, ovvero dell'intervallo di tempo che intercorre tra l'applicazione dello stimolo e l'inizio del ciclo di nuoto.

Un gruppo di animali (gruppo sperimentale) è stato sottoposto per 6 giorni consecutivi a sessioni di addestramento: il 6° giorno si è osservato un forte decremento della risposta comportamentale rispetto al 1° giorno indicando che si è instaurata abitudine LT. Un gruppo di animali (controllo) sono stati manipolati ma non addestrati come il gruppo sperimentale e

quando sottoposti il 1° e il 6° giorno ad una seduta di abitudine hanno mostrato un andamento nel tempo delle latenze del tutto sovrapponibile.

Alcuni animali sono stati sottoposti a sedute quotidiane, di 15 stimoli test applicati ad intervalli random secondo tabelle costruite tra 30 secondi e 2 minuti: in queste condizioni sperimentali non si è avuta abitudine né il primo né il sesto giorno così come in animali manipolati ma non sottoposti ad addestramento quotidiano.

Si ha sensitizzazione, quando la latenza allo stimolo test si riduce in seguito all'applicazione di uno stimolo nocicettivo.

Per ottenere sensitizzazione BT gli animali vengono sottoposti a 4 stimoli test ad intervalli random, per individuare la loro risposta basale, successivamente a 15 spazzolate sul dorso a cui seguono tre stimoli test ad intervalli di 5 minuti. Le latenze registrate dopo quest'ultimi risultano diminuite rispetto alla risposta basale.

Un gruppo di animali, dopo essere stato sottoposto il 1° giorno a sensitizzazione BT, ha ricevuto per 5 giorni consecutivi stimoli nocicettivi rappresentati da serie di 15 spazzolate ripetute per 4 volte a distanza di 10 minuti. Il 6° giorno sono stati sottoposti nuovamente ad una sessione di sensitizzazione e hanno mostrato un incremento della risposta dopo stimolazione nocicettiva molto maggiore rispetto a quella registrata il 1° giorno. Animali di controllo, sottoposti a sensitizzazione il 1° e il 6° giorno ma non sottoposti a stimoli nocicettivi durante i restanti 5 giorni, hanno mostrato risposte del tutto sovrapponibili.

Una volta individuato un protocollo sperimentale tramite il quale stimoli ripetuti quotidianamente inducevano modificazioni del comportamento dell'animale a lungo termine, siamo andati ad analizzare se tali modificazioni dipendessero dalla sintesi ex

novo di proteine nel sistema nervoso. A tale scopo abbiamo valutato il comportamento di animali ai quali era stata somministrata cicloesimide 10^{-3} M, inibitore della sintesi proteica.

Sia gli animali sottoposti a protocollo di abitudine LT sia gli animali sottoposti a protocollo di sensitizzazione LT e trattati giornalmente con l'inibitore, non hanno mostrato apprendimento a lungo termine. Questi risultati indicano che la formazione ex-novo di proteine nel sistema nervoso sarebbe alla base del consolidamento dei processi mnemonici.

Tramite gel monodimensionale (SDS-PAGE) abbiamo infatti visualizzato profili proteici diversi tra l'omogenato di catene nervose di animali sensitizzati LT rispetto a quelli di controllo.

SUMMARY

In the invertebrate nervous system it is possible to identify all cells that form the neural networks underlying different behaviors and to study, at cellular level, the plastic changes that occur during learning and memory processes. In particular, the leech *H. medicinalis* represents an useful model for the study of the cellular and molecular mechanisms underlying learning.

In order to assess the molecular mechanisms inducing forms of long-term (LT) non associative learning, such as habituation and sensitization, we have carried out behavioral experiments in the leech *H. medicinalis*. The study has been extended to a molecular analysis in order to obtain indications about the role of the protein synthesis in the LT learning.

Swimming induction has been studied. To elicit swimming we used a weak electrical stimulus (stimulus test) applied on the skin of the tail portion of the animal that had previously undergone the microsurgical section of the first segmental ganglion from the head ganglion. Leeches trained with 15 trials at 1 minute inter-trial interval (ITI) exhibited short term (ST) habituation that consisted of a progressive increase of the time between the electrical stimulation and the onset of the swimming, named latency.

A group of animals (experimental group) trained for 6 consecutive days with ST habituation sessions exhibited the 6th day a stronger decrement of the behavioral response than the 1st day indicating that habituation LT occurred. A group of animals (controls) were only manipulated for 5 days like the experimental group but not trained; when subjected to a ST habituation session

at the 6th day they exhibited a decrease of the latency similar to the one exhibited in the 1st habituation session.

In order to assess the role of a constant ITI in inducing LT habituation, a group of leeches was subjected to 15 test stimuli delivered at non-constant ITI, randomly generated in a time interval ranging from 30 s to 2 min. No significant changes of the latencies were observed in all training sessions performed.

Leeches exhibit sensitization when the latency to the test stimulus is reduced in comparison with the baseline response after the application of nociceptive stimulation.

In a sensitization session, the baseline response is obtained by the average of the responses (Lm) to 4 test stimuli delivered at random intervals taken as 100%. A nociceptive stimulation, such as 15 brushings on the dorsal body wall, produces an increase of the response to 3 test stimuli delivered soon after at 5 minutes ITI. In fact, in these experimental conditions the latencies recorded are reduced in comparison with Lm showing that ST sensitization occur.

A group of animals trained with a ST sensitization session have received for the subsequent 5 days, 4 series of 15 brushing delivered at 10 minutes intervals. The 6th day they were trained with a sensitization session and exhibited an increase of the response to test stimuli greater than the one exhibited at the 1st day.

Otherwise, animals (control group) trained with a sensitization session in the 1st and 6th day without receiving nociceptive stimulation in the other 5 days exhibited comparable sensitization in both days.

Once devised the experimental protocol for inducing LT behavioral changes, we have analyzed if such changes were

dependent on ex novo protein synthesis in the nervous system. At this aim, we have evaluated behavioral responses of animals injected with 10^{-3} M cycloheximide, a protein synthesis inhibitor.

Animals injected with the inhibitor have been trained with LT habituation sessions and did not exhibited LT learning as well animals injected with cycloheximide and trained with LT sensitization sessions. These results indicate that ex-novo protein synthesis in the nervous system underlies the mnestic consolidation.

Some preliminary molecular analyses carried out with monodimensional SDS-PAGE technique have revealed different protein expression in homogenates of ganglionic chains of LT sensitized animals in comparison with the ones obtained with control animals.

INDICE

1.INTRODUZIONE	pag. 1
1.1 L'apprendimento e la memoria	pag. 2
1.2 Apprendimento LT	pag. 4
1.3 Modello sperimentale: <i>H. medicinalis</i>	pag. 8
1.3.1 Anatomia	pag. 9
1.3.2 Comportamento	pag. 16
1.4 Il circuito neurale del nuoto	pag. 17
1.5 Apprendimento non associativo in <i>H. medicinalis</i>	pag. 20
 2. SCOPO DELLA TESI	 pag. 27
 3. MATERIALI E METODI	 pag. 29
3.1 Animali	pag. 29
3.2 Procedure comportamentali	pag. 30
3.3 Estrazione di proteine da tessuto nervoso gangliare	pag. 33
3.4 Elettroforesi SDS-PAGE	pag. 34
3.5 Sostanze	pag. 35
3.6 Analisi dei dati	pag. 36

4. RISULTATI

pag. 38

4.1 Abitudine a lungo termine in *H. medicinalis*

pag. 38

4.2 Sensitizzazione a lungo termine in *H. medicinalis*

pag. 41

4.3 Effetti della cicloesimide sull'apprendimento a lungo termine

pag. 44

4.4 Effetti della cicloesimide sull'abitudine a lungo termine

pag. 45

4.5 Effetti della cicloesimide sulla sensitizzazione a lungo termine

pag. 47

4.6 Analisi molecolare tramite SDS-PAGE

pag. 50

5. DISCUSSIONE

pag. 52

6. BIBLIOGRAFIA

pag. 58

1. INTRODUZIONE

L'apprendimento si è sviluppato durante l'evoluzione dotando gli organismi di potenti capacità adattative.

Tramite diverse strategie individuate dalla psicologia sperimentale, è stato possibile distinguere vari tipi di apprendimento. Sono state così distinte forme di apprendimento più elementari definite “apprendimento non associativo” da quelle più complesse note come “apprendimento associativo”. Tutti gli animali possiedono la capacità di esprimere queste forme di apprendimento e ciascuna di esse dà origine a memoria sia a breve (BT) che a lungo termine (LT).

Lo studio dell'apprendimento e della memoria si avvale di tecniche di indagine della neurobiologia cellulare che ha ottenuto notevoli risultati esaminando le forme più elementari dell'apprendimento non associativo quali l'abitudine e la sensitizzazione in modelli sperimentali semplici. In questo approccio riduzionista, la sanguisuga *H. medicinalis* rappresenta un ottimo modello sperimentale per condurre studi neurobiologico-comportamentali sui meccanismi di plasticità neuronale alla base dell'apprendimento. Infatti, in questo Invertebrato è possibile analizzare i processi di apprendimento e memoria studiando contemporaneamente i cambiamenti che avvengono in un singolo atto comportamentale e le modificazioni che si osservano nel circuito neurale che ne è alla base.

H. medicinalis esibisce atti comportamentali tra cui il nuoto, lo *shortening*, il *crawling* e il *local bending* le cui reti neurali sono state identificate in dettaglio (Nusbam & Kristan, 1986; Friesen, 1989; Shaw & Kristan, 1999; Kristan et al., 2000; Friesen & Cang, 2001; Brodfuehrer & Thorogood, 2001). In passato,

prendendo in esame l'atto comportamentale del nuoto è stato possibile indurre abitudine e sensitizzazione BT (Zaccardi et al., 2001).

Dati i vantaggi sperimentali che *H. medicinalis* offre, è sembrato interessante utilizzare questo modello sperimentale anche per l'analisi dei meccanismi che sostengono il passaggio da apprendimento BT ad apprendimento LT.

1.1 L'APPRENDIMENTO E LA MEMORIA

Il comportamento di qualunque essere vivente dipende dall'interazione di fattori genetici e ambientali. I più importanti meccanismi con cui l'ambiente influisce sul comportamento sono l'apprendimento e la memoria. L'apprendimento è il processo mediante il quale vengono acquisite informazioni dal mondo circostante; la memoria è il processo mediante il quale tale conoscenza viene codificata, conservata e successivamente utilizzata.

Sono state descritte due forme di memoria:

- 1) memoria implicita o non dichiarativa, la quale riguarda le capacità percettive e le abilità motorie e che viene richiamata alla mente in modo non cosciente; sono esempi di memoria implicita l'addestramento all'esecuzione di compiti motori o percettivi di tipo riflesso (Squire et al., 1994);
- 2) memoria esplicita o dichiarativa, molto duttile che riguarda il ricordo di persone, luoghi e oggetti e richiede un ricordo consapevole (Squire, 1992) .

Paradigmi sperimentali, condotti su animali per studiarne la memoria implicita, hanno messo in evidenza che tale tipo di memoria può essere distinta in due forme: associativa e non associativa. L'apprendimento associativo si manifesta quando il soggetto apprende quali siano le relazioni che intercorrono fra due stimoli o fra uno stimolo ed una risposta comportamentale. L'apprendimento associativo si può distinguere ulteriormente in due forme.

- condizionamento classico, che si basa sull'apprendimento, da parte degli animali, delle relazioni che intercorrono tra due stimoli distinti e nella conseguente acquisizione della capacità di rispondere a stimoli inizialmente neutri (Pavlov, 1927) .
- condizionamento operante, che consiste nell'associazione da parte del soggetto di un comportamento, definito operante, ad un certo tipo di risposta. Quando un comportamento da parte del soggetto determina una risposta ambientale positiva, detta di rinforzo, l'azione viene ripetuta con una frequenza sempre maggiore. Se invece la risposta ambientale è negativa (punizione) o neutra il soggetto tende a non ripetere l'azione.(Skinner, 1938).
L'apprendimento non associativo si manifesta quando il soggetto è esposto ripetutamente ad uno stimolo e impara a distinguerne le proprietà. Le forme di apprendimento non associativo più comuni sono:

- L'**abitudine**, definita come un progressivo decremento di una risposta comportamentale normalmente evocata da stimoli non nocivi, privi di significato per la sopravvivenza dell'animale e presentati in maniera ripetuta. Da questo concetto è escluso l'adattamento sensoriale e la fatica muscolare.

- La **sensitizzazione**, mediante la quale gli animali, esposti a stimoli nocicettivi, potenziano i loro comportamenti difensivi e rispondono a stimoli test con maggiore efficacia; quando questo potenziamento della risposta comportamentale si instaura su una risposta precedentemente decrementata in seguito ad abitudine, si parla di **disabitudine**.

L'apprendimento può portare a plasticità neuronale ovvero a cambiamenti della biochimica e della struttura delle sinapsi.

In relazione al tempo necessario per indurre questi cambiamenti plastici si distinguono due tipologie di apprendimento: a breve termine (BT), che dura da pochi minuti ad un massimo di 24 ore, e (LT), che perdura per giorni, settimane o addirittura per tutta la vita di un individuo (McGaugh. 1966 ; Rosenzweig et al. 1993).

1.2 APPRENDIMENTO LT

Mentre tutti gli eventi molecolari che conducono all'abitudine non sono stati ancora chiariti nel dettaglio, quelli alla base della sensitizzazione sono ben conosciuti

È noto che i meccanismi alla base dell' apprendimento BT si basano sulla fosforilazione di proteine preesistenti (Kandel& Schwartz, 1982; Macky et al., 1989; Byrne, 1994).

Un notevole contributo alla comprensione di questi meccanismi è stato fornito dagli studi effettuati sul riflesso di retrazione della branchia e del sifone nel mollusco marino *Aplysia californica*.. (Kandel& Schwartz, 1982). In questo modello, lo stimolo sensitizzante attiva un gruppo di neuroni facilitatori (cellule serotoninergiche) estrinseci al circuito del riflesso che prendono

contatto con i neuroni sensoriali dell'arco afferente determinando un aumento del rilascio di trasmettitore da parte dei terminali sinaptici di tali cellule. (Macky et al. , 1989). La serotonina (5HT) liberata si lega a due diversi tipi di recettori: un recettore accoppiato all'adenilato ciclasi che porta ad un aumento dei livelli intracellulari di cAMP e quindi all'attivazione di protein chinasi cAMP-dipendenti (PKA); e un recettore, probabilmente accoppiato alla fosfolipasi C, che determina la formazione di diacilglicerolo e l'attivazione di protein chinasi calcio-dipendenti (PKC) (Byrne, 1994). PKC agendo in parallelo con PKA modula la corrente K^+ voltaggio dipendente e aumenta la disponibilità delle vescicole di neurotrasmettitore e la loro mobilitazione verso le zone attive (Baxter & Byrne, 1990; Byrne, 1994) con un conseguente aumento del rilascio spontaneo che è indipendente dalle variazioni dei livelli intracellulari di Ca^{++} (Byrne & Kandel, 1996).

Le ricerche finora compiute sull'apprendimento LT in vari modelli animali suggeriscono un ruolo fondamentale della sintesi proteica nel passaggio da BT a LT: si ritiene, infatti, che nelle reti neurali avvenga la formazione ex novo di proteine che stabilizzerebbero i meccanismi operanti nella memoria BT dando luogo a cambiamenti cellulari persistenti.

I risultati più incisivi si sono ottenuti dagli studi condotti in *Aplysia* (Kandel et al., 2000) sul riflesso di retrazione del sifone. Nella sensitizzazione LT, l'applicazione ripetuta di uno stimolo nocicettivo sulla coda dell'animale porta al potenziamento dell'efficacia sinaptica tra i neuroni sensoriali e quelli motori nel ganglio addominale. Ciò si realizza attraverso l'attivazione

prolungata di PKA che, tramite il suo sito catalitico, attiva un'altra protein-chinasi (MAPK) che funziona da secondo messaggero. Insieme traslocano nel nucleo e attivano un fattore di trascrizione CREB1 (*cAMP responsive element binding protein*) che si lega ad un promotore della trascrizione CRE (*cAMP responsive element*). Per mezzo di MAPK l'unità catalitica di PKA agisce anche reprimendo l'attività inibitoria di un repressore della trascrizione CREB2. Questa cascata di eventi molecolari porta ad un aumento della trascrizione, favorendo la formazione di apprendimento non associativo LT (Kaang et al., 1993; Abel & Kandel, 1998).

L'attivazione dei fattori di trascrizione si è rivelata un fenomeno molto importante per i processi di apprendimento LT in altre specie animali. In *Drosophila melanogaster* la memoria LT è compromessa in seguito all'induzione di un repressore di CREB1 (Silva et al., 1998). Topi con mutazioni a livello di CREB hanno gravi alterazioni della memoria LT (Zhou Y. et al., 2009).

L'attivazione di questi fattori di trascrizione porta a modificazioni strutturali che caratterizzano l'apprendimento LT: la formazione di nuove connessioni sinaptiche, l'aumento del numero dei terminali sinaptici e dell'area recettiva postsinaptica nei neuroni effettori (Bailey et al., 1992).

Esperimenti condotti utilizzando inibitori della sintesi proteica hanno dimostrato che le modificazioni strutturali che avvengono nell'apprendimento LT si realizzano attraverso la sintesi ex-novo di proteine.

Apis mellifera, risponde con l'estensione della proboscide alla presentazione di due stimoli accoppiati: acqua zuccherata e stimolo olfattivo. L'ape, che impara ad associare i due stimoli,

continuerà ad estendere la proboscide al solo stimolo olfattivo. Il trattamento con l'inibitore della sintesi proteica cicloesimide, inibisce l'incorporazione di 3H-leucina nelle proteine del cervello del 95% per più di 3 ore facendo sì che l'animale non risponda con la distensione della proboscide al solo stimolo olfattivo. (Wittstock et al., 1993).

Analogamente la cicloesimide inibisce l'abitudine LT nel granchio *Chasmagnathus*. In uno studio condotto da Pedreira e collaboratori (1994) è stata osservata l'influenza dell'iniezione di 10 µg o di 20 µg di inibitore sulla risposta di fuga che il granchio attua al passaggio di un'ombra sulla sua testa. Normalmente, alla presentazione ripetuta dell'ombra l'animale mostra una riduzione della risposta comportamentale. La somministrazione cicloesimide inibiva l'incorporazione del [¹⁴C]-amminoacido nei gangli toracici dell'88% e del 92% rispettivamente, compromettendo la normale riduzione della risposta durante le prime 24 ore.

Studi sul comportamento predatorio della seppia *Sepia officinalis* hanno mostrato che animali iniettati con 10 mg/Kg di peso corporeo di cicloesimide diluiti in soluzione fisiologica 10 mg/ml avevano compromessa la capacità di ritenere per 24 informazioni acquisite durante addestramento al riconoscimento della preda: infatti, l'animale, che normalmente, tenta di prendere la preda (gamberi) con rapidi colpi di tentacolo; quando i gamberi venivano posti in una teca di vetro, gli animali sperimentali, impossibilitati a raggiungere la preda, mostravano riduzione della risposta predatoria. Gli animali iniettati con cicloesimide, invece per 24 ore perdevano la capacità di distinguere che i gamberi non erano più prendibili. (Agin et al., 2003).

Studi condotti in *Aplysia* hanno consentito di evidenziare una modulazione dell'espressione di alcune proteine nella sensitizzazione LT. Tra queste ricordiamo: l'actina, la clatrina, la tubulina, e quattro molecole di adesione cellulare (D1,D2,D3 e D4) riferite al complesso NCAM (*neural cel adhesion molecule*). Queste proteine sono coinvolte nei cambiamenti strutturali, quali la crescita di nuove connessioni sinaptiche, l'aumento del numero di nuovi terminali sinaptici e dell'area recettiva post sinaptica, che si verificano nelle fasi iniziali dell'apprendimento LT (Noel et al., 1993).

1.3 MODELLO SPERIMENTALE: *H. MEDICINALIS*

In un approccio sperimentale che prevede osservazioni comportamentali e indagini a livello cellulare e molecolare, è necessario disporre di un modello che, alla semplicità anatomica, associ comportamenti complessi organizzati in circuiti neurali semplici. La sanguisuga *Hirudo medicinalis* possiede queste caratteristiche che l'hanno resa un buon modello sperimentale per indagare vari aspetti della funzionalità del SN, dai fenomeni di apprendimento e memoria a livello comportamentale, ai meccanismi di integrazione che possono avvenire a livello delle reti neurali.

1.3.1 Anatomia

H. medicinalis è un anellide appartenente alla famiglia degli *Hirudinidae*; è un ectoparassita ematofago che vive principalmente in acque dolci, con capacità di movimento sia in acqua che su substrato solido.

La sanguisuga presenta un'organizzazione metamerica delle strutture somatiche e viscerali tipica del *phylum* degli Anellidi.

Il corpo è formato dalla ripetizione di 34 segmenti metamERICI; fanno eccezione i 2 segmenti alle estremità, formati dalla fusione di più metameri, i quali presentano ventose. La ventosa rostrale, o anteriore, è specializzata per nutrirsi del sangue dell'ospite mentre la ventosa caudale, o posteriore, è specializzata nell'ancorarsi al substrato durante l'esplorazione dell'ambiente circostante (*crawling*) e serve per la locomozione (Fig. 1).

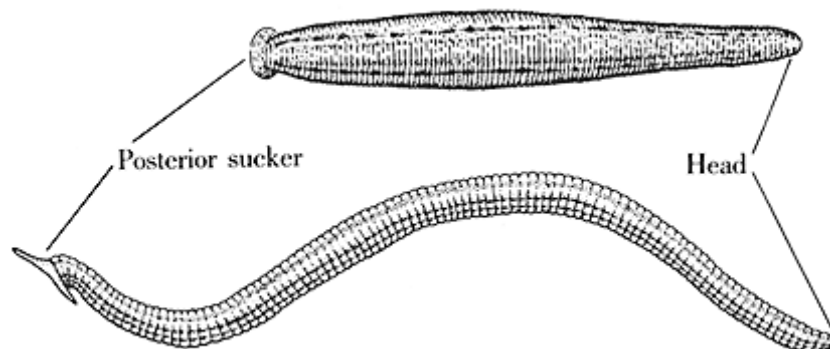


Fig. 1: Morfologia esterna della sanguisuga *H. Medicinalis*

Il peso dell'animale adulto può variare da 1 a 5 g ma può aumentare notevolmente in seguito ad un pasto con il quale la sanguisuga è in grado di ingerire da 5 a 10 ml di sangue. A riposo, la lunghezza della sanguisuga varia da 4 a 10 cm.

La massa nervosa caudale, invece, è costituita dalla fusione di sette gangli segmentali ed innerva la ventosa caudale.

La catena gangliare decorre medialmente per tutta la lunghezza dell'animale; è disposta centralmente all'apparato digerente ed è contenuta all'interno del seno venoso ventrale, avvolta da tessuto connettivo

Ogni ganglio è connesso a quelli adiacenti mediante il connettivo intergangliare, nel quale decorrono le fibre nervose organizzate in due cordoni laterali e uno mediale (chiamato nervo di Faivre) all'interno del quale decorrono gli assoni dei neuroni S (Bagnoli et al., 1973) e delle cellule 204 e 205 facenti parte del circuito del nuoto (Weeks & Kristan, 1978).

Da ogni ganglio segmentale, inoltre, si dipartono quattro radici laterali, due posteriori e due anteriori, che si dirigono verso la periferia.

Ciascun ganglio della catena è costituito da circa 400 neuroni e innerva un preciso segmento corporeo. Fanno eccezione il 5° e 6° ganglio che innervano gli organi sessuali e che sono costituiti da circa 700 cellule nervose (Macagno, 1980).

L'organizzazione neuronografica dei gangli segmentali è pressoché inalterata in tutta la corda nervosa.

In ogni singolo ganglio i corpi cellulari dei neuroni sono contenuti in sei pacchetti, o compartimenti follicolari, quattro laterali e due ventro-mediali, ciascuno dei quali è costituito dai prolungamenti di una cellula gliale che avvolge i pirenofori.

All'interno di ogni singolo ganglio segmentale è possibile identificare un numero determinato di motoneuroni, interneuroni e neuroni sensoriali che sono organizzati in reti neurali che sottendono tutti gli atti comportamentali che l'animale esibisce.

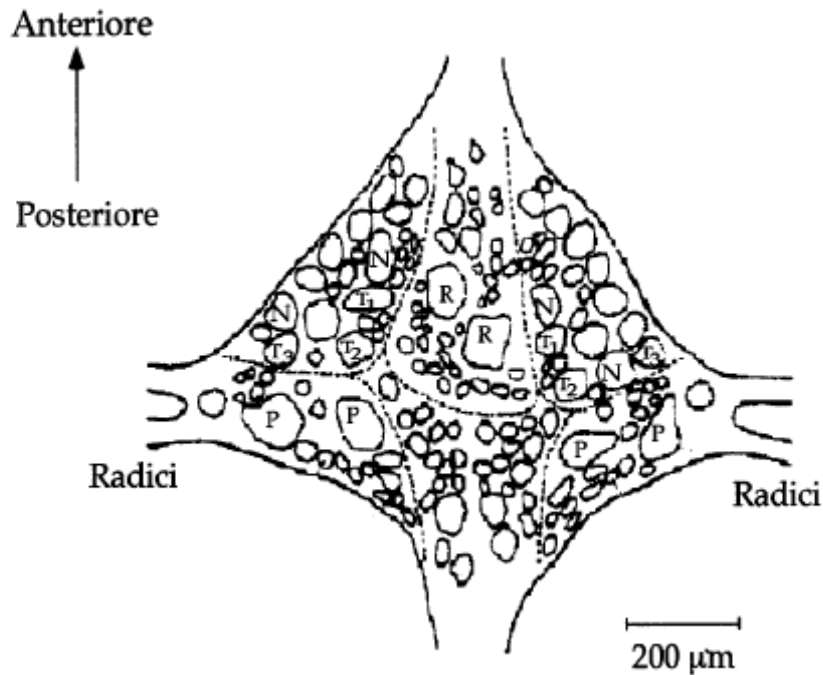


Fig. 3: Schema del lato ventrale di un ganglio segmentale. Sono evidenti i neuroni sensoriali T, P e N e le cellule serotoninergiche di Retzius.

In ogni ganglio riconosciamo trentaquattro motoneuroni (Stuart, 1970) di cui ventotto ad attività eccitatoria e sei ad attività inibitoria.

Particolarmente studiati sono quelli responsabili della contrazione muscolare durante il nuoto e il motoneurone 1. Questo si trova sul lato dorsale del ganglio e innerva la muscolatura longitudinale che si contrae quando l'animale accorcia il corpo (*shortening*).

Tra gli interneuroni ricordiamo:

- i neuroni serotoninergici in numero variabile da 7 a 9, la cui distribuzione non è omogenea: infatti il loro numero decresce in senso rostro-caudale, da un massimo di 10 neuroni nella massa cefalica e nei gangli più rostrali ad un minimo di 4 in quelli più caudali. Per questo motivo il contenuto medio di serotonina per ganglio risulta essere massimo nei gangli 2°, 3° e 4° e minimo

serotoninergici sono particolarmente distinguibili 2 cellule con diametro di circa 80 μM , le cellule giganti di Retzius. La 5HT regola la produzione di muco da parte della cute (Lent, 1973) e determina il rilassamento dei muscoli longitudinali del corpo (Leake & Koubanakis, 1995) e lo stato d'allerta dell'animale (Willard, 1981). Queste due cellule sono connesse tra loro da sinapsi elettriche (Vazquez et al., 2009) che sono modulate in senso disaccoppiante da 5HT e dopamina (Colombaioni & Brunelli, 1988)). Altri neuroni serotoninergici sono una coppia di interneuroni dorso-laterali (cellule 61 o DL) ed una coppia di interneuroni ventro-laterali (cellule 21 o VL) che fanno parte del circuito del nuoto (Lent et al., 1991).

- Gli interneuroni S presenti sul lato ventrale di ogni ganglio (Bagnoli et al., 1973) costituiscono il “sistema a rapida conduzione” che permette all'impulso di propagarsi velocemente per tutta la catena gangliare tramite sinapsi elettriche non rettificanti. Infatti, dal loro corpo cellulare si diparte un assone che si divide poi in due rami: uno diretto anteriormente e l'altro posteriormente. Tali diramazioni costituiscono la fibra di Rhode che decorre all'interno del nervo di Faivre. Ogni fibra di Rhode, uscente da un ganglio, prende contatto sinaptico con la cellula S del ganglio adiacente, costituendo un sistema di conduzione veloce di impulsi, collegato a una via efferente di uscita data dal motoneurone L. Tale sistema di conduzione chiamato *Fast Conducting System* (FCS) (Bagnoli et al., 1973) ha il compito di coordinare i movimenti dell'intero corpo dell'animale durante l'accorciamento (*shortening*), in risposta agli stimoli di natura meccanica (Magni & Pellegrino, 1978). Ogni ganglio contiene una singola cellula S che riceve segnali dai neuroni sensoriali T

attraverso una coppia di interneuroni (Muller et al., 1981); le cellule S, a loro volta, contraggono sinapsi con le cellule L, una coppia di motoneuroni bilaterali che attivano tutta la muscolatura longitudinale in ogni singolo segmento, provocando così l'accorciamento dell'animale. Durante l'accorciamento le cellule S sono attive (Magni & Pellegrino, 1978). Inoltre è stato provato che la 5HT aumenta l'eccitabilità della cellule S promuovendo lo *shortening* e inducendo sensitizzazione (Burrell & Sahley, 2005). Infine, all'interno di ogni ganglio sono visibili sul lato ventrale (Fig. 3) tre diversi tipi di meccanocettori che rispondono a selettivi stimoli tattili applicati alla cute dell'animale. Essi sono così distribuiti:

- 6 cellule T (tre per ogni pacchetto antero-laterale), denominate T1, T2 e T3, che rispondono a lievi stimoli tattili applicati alla cute dell'animale;
- 4 cellule P (due per ogni pacchetto postero-laterale), che si attivano in seguito a stimoli pressori;
- 4 cellule N (due per ogni pacchetto antero-laterale), che rispondono a stimoli di natura nocicettiva (Baylor & Nicholls 1969; Van Essen, 1973).

Le cellule sensoriali sono tutte di tipo unipolare e mostrano sempre ampie arborizzazione: indagini morfologiche hanno messo in evidenza alcune differenze tra di esse che riguardano la loro distribuzione e la forma dei contatti sinaptici all'interno di ciascun ganglio (Muller & McMahan, 1976). Le cellule T contraggono tra di loro sinapsi miste elettriche e chimiche: le connessioni di tipo elettrico sono molto particolari perché permettono la conduzione degli impulsi depolarizzanti in entrambe le direzioni ma impediscono il passaggio di correnti

iperpolarizzanti (sinapsi a doppia rettificazione) (Bagnoli et al., 1973). I neuroni T sono connessi tra loro anche da sinapsi chimiche mediate sia da neuroni inibitori che eccitatori.

Tutti i neuroni sensoriali prendono contatto monosinaptico prevalentemente di tipo elettrico con il motoneurone L.

I neuroni sensoriali di tipo T, P, N nei gangli segmentali e subesofageo, costituiscono il primo elemento del circuito del nuoto: l'attivazione di queste cellule determina una serie di successive attivazioni dei gruppi di neuroni dei sottostanti livelli che determina l'inizio dell'attività natatoria. Registrazioni intracellulari hanno inoltre dimostrato che le tre classi di cellule hanno una caratteristica comune: l'iperpolarizzazione postuma o AHP che consiste in una deflessione in senso iperpolarizzante del voltaggio di membrana associata alla scarica quando questi vengono attivati.

L'AHP può essere modulata in senso positivo, infatti se stimoliamo ripetutamente con interstimolo costante la cellula T (come possiamo pensare avvenga durante l'abitudine comportamentale) aumenta l'ampiezza dell'AHP. Questo è dovuto ad un aumento dell'attività della pompa $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasi}$ (Scuri et al., 2002) per azione dei metaboliti dell'acido arachidonico derivati dalla via 5-lipoossigenasica (Scuri et al., 2005).

Un dato interessante è che all'aumento dell'ampiezza dell'AHP corrisponde una ridotta liberazione del neurotrasmettitore. Ciò si manifesta come una riduzione del potenziale sinaptico registrato in un neurone *follower*. Al contrario è stato osservato che ad una diminuzione dell'ampiezza dell'AHP corrisponde un aumento

dell'efficacia sinaptica tra il neurone T e la cellula *follower* (Scuri et al., 2005).

1.3.2 Comportamento

Nonostante la semplicità del suo SN, la sanguisuga *H. medicinalis* presenta atti comportamentali piuttosto complessi regolati da circuiti neuronali che sono ben conosciuti ed è quindi possibile correlare cambiamenti del comportamento con modificazioni dell'attività cellulare. L'animale mostra vari atti comportamentali:

- Il *crawling*, un comportamento ritmico caratterizzato da 2 fasi principali, estensione del corpo e contrazione del corpo, tipicamente coordinato dall'attacco e il rilascio delle 2 ventose (Cacciatore et al., 2000).
- Lo *shortening*, un accorciamento generalizzato del corpo dell'animale, indotto in risposta a forti stimoli fotici (Bagnoli et al., 1975; Lockery & Kristan, 1985; Lockery et al., 1985) o tattili (Bagnoli et al., 1975; Boulis & Sahley, 1988) per contrazione simultanea dei muscoli longitudinali presenti in tutti i segmenti corporei.
- Il *local bending*, ovvero la flessione del corpo compiuta dall'animale in risposta ad una lieve stimolazione meccanica della cute, per contrazione dei muscoli longitudinali del lato stimolato e rilassamento di quelli del lato opposto nell'ambito del segmento interessato dalla stimolazione (Lockery & Kristan, 1990; 1991).

- Lo *swimming* (nuoto) che si esprime con comportamenti episodici. Inizia in seguito ad una vasta gamma di *inputs* sensoriali tra cui sono inclusi la stimolazione tattile della parete corporea e i movimenti dell'acqua (Kristan et al., 2005).

1.4 IL CIRCUITO NEURALE DEL NUOTO

La sanguisuga nuota mediante movimenti ondulatori, caratterizzati dall'estensione e dall'appiattimento del corpo sul piano dorso-ventrale.

Il nuoto è determinato dalla contrazione alternata dei muscoli longitudinali dorsali e ventrali, che producono un'onda che si muove rapidamente in direzione antero-posteriore; inoltre, la contrazione di ciascun muscolo segmentale precede quella del muscolo segmentale adiacente ed è proprio questo ritardo nelle contrazioni che assicura la progressione dell'onda (Stent e Kristan, 1981; Kristan, 1983) (Fig. 4).

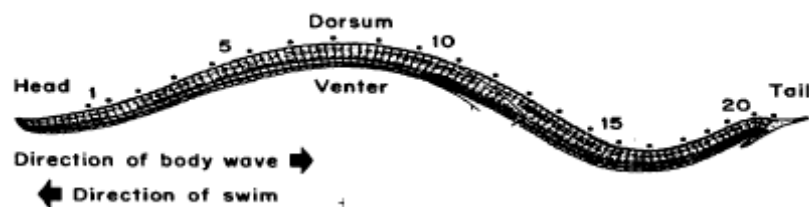


Fig. 4: Movimenti ondulatori di tipo sinusoidale che si verificano durante il nuoto.

Alla base del nuoto c'è un complesso circuito cellulare che induce e controlla i movimenti natatori dell'animale. Le cellule che costituiscono questo circuito sono state identificate e classificate in cinque diversi tipi funzionali: neuroni sensoriali, neuroni *trigger*, interneuroni *gating*, interneuroni oscillatori e motoneuroni. (Fig. 5).

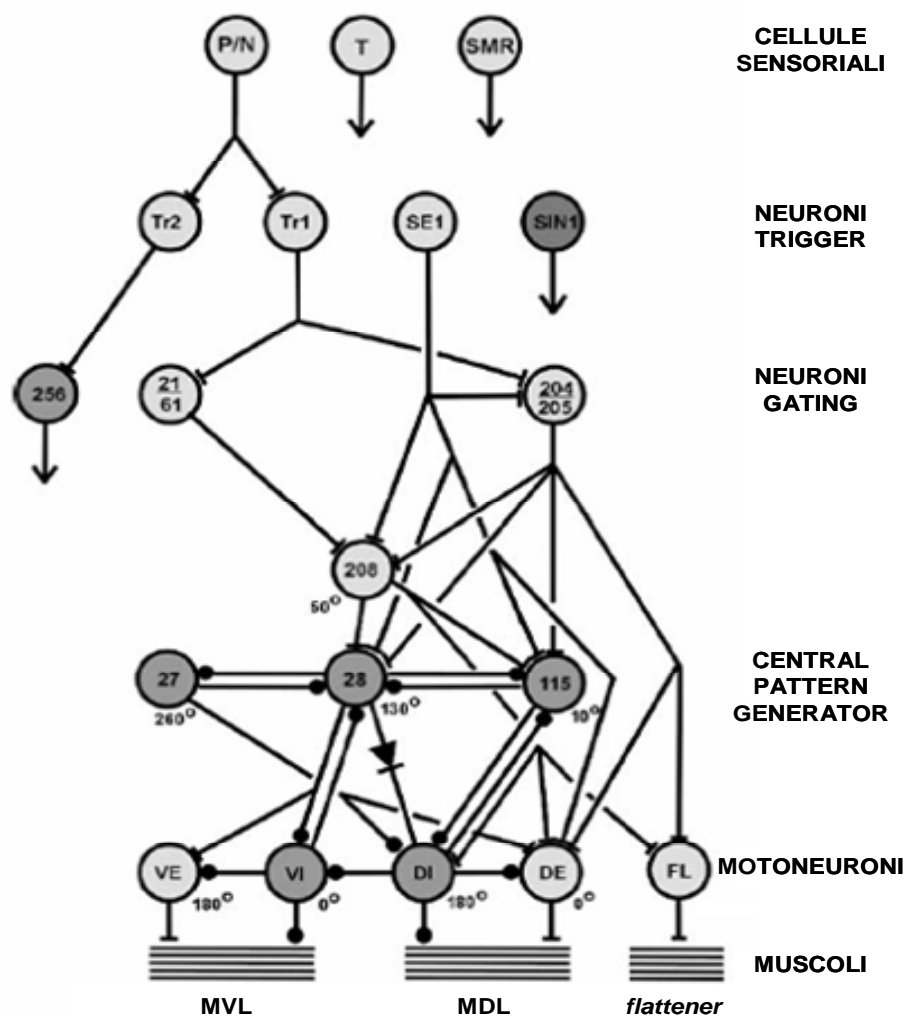


Fig. 5: Rappresentazione schematica del circuito del nuoto. Spiegazione nel testo. (Modificato da: Brodfuehrer & Friesen, 1986)

Una forte stimolazione tattile della parete del corpo di una sanguisuga intatta ne provoca il nuoto: la stimolazione delle cellule sensoriali (**T**, **P** e **N**), nei gangli segmentali e nel ganglio subesofageo, attiva i neuroni trigger (**Tr₁**, **Tr₂**, **Tr₃**), inducendo così la cascata di eventi e di interazioni che determinano il nuoto (Friesen & Kristan, 2007). I neuroni **Tr₁** sono cellule glutammatergiche che proiettano i propri assoni posteriormente lungo la corda nervosa ventrale fino al 18° ganglio. Le cellule **Tr₁** eccitano direttamente i neuroni *gating* e le cellule serotoninergiche di Retzius, entrambi in grado di dare inizio all'attività natatoria (Brodfuehrer & Friesen, 1986b) tramite l'attivazione di recettori per il glutammato di tipo non-NMDA (Thorogood & Brodfuehrer, 1995).

Al contrario, le cellule **Tr₂** hanno un effetto inibitorio su questi neuroni e su molti neuroni oscillatori. **Tr₁** e **Tr₂**, quindi, sono in grado di indurre il nuoto attraverso due vie parzialmente indipendenti (Brodfuehrer & Friesen, 1986b,d; O'Gara & Friesen, 1995).

La terza coppia di neuroni *trigger* (**Tr₃**), determina l'attivazione dei “neuroni contenenti serotonina” e viene a sua volta attivata dalle cellule sensoriali **P** (Brodfuehrer & Friesen, 1986c).

I neuroni gating sono suddivisi in due classi di cellule: gli “interneuroni iniziatori del nuoto” (**SII**, *Swim Initiating Interneurons*) rappresentati dalle cellule **204** e **205**, e gli “interneuroni contenenti serotonina” (**SCN**, *Serotonin Containing Interneurons*) rappresentati dalle cellule **61** (o **VL**) e **21** (o **DL**). La cellula **204** è un neurone impari che si trova nei gangli 10°-16°; la cellula **205** è anch'essa impari, ma è presente soltanto nel

9° ganglio e proietta solo anteriormente; le cellule **61** e **21** sono, invece, presenti in coppia in ogni ganglio segmentale.

1.5 APPRENDIMENTO NON ASSOCIATIVO IN *HIRUDO* *MEDICINALIS*

Molti dei comportamenti esibiti da *H. medicinalis* vanno incontro a forme di apprendimento non associativo (abitudine, sensitizzazione e disabitudine): il nuoto (Debsky & Friesen, 1985; Zaccardi et al., 2001; 2004), il *local bending* (piegamento del corpo su se stesso) (Lockery & Kristan, 1985, 1990, 1991) ed il riflesso di accorciamento in risposta a stimoli fotici (Bagnoli et al., 1975; Lockery et al., 1985) o tattili (Bagnoli et al., 1975; Boulis & Sahley, 1988; Sahley & Burrell, 1998).

Da questi studi emerge che l'abitudine, anche nella sanguisuga, è influenzata da due variabili: l'intensità dello stimolo abituante e l'intervallo tra uno stimolo e l'altro. Lievi stimoli applicati con un ritmo veloce sono più efficaci nell'indurre abitudine rispetto a stimoli dello stesso tipo, applicati ad un ritmo più lento (Groves et al., 1969; Groves & Thomson, 1970; Sahley, 1995). Nel riflesso di accorciamento (*shortening*), i cambiamenti plastici dell'abitudine e della sensitizzazione avvengono a livello del circuito nervoso che va dalle cellule meccanocetttrici ad una catena di neuroni elettricamente accoppiati, le cellule S, che costituiscono il *Fast Conducting System* (FCS) (Bagnoli et al.,

1975). La stimolazione tattile ripetuta della cute provoca abitudine della risposta di FCS; al contrario, sia il riflesso di *shortening* sia la scarica delle cellule S in risposta ad uno stimolo test innocuo, risultano aumentati per alcuni minuti dopo l'applicazione di uno stimolo nocicettivo (sensitizzazione e disabitudine). L'integrità del sistema FCS è indispensabile per l'induzione di apprendimento non associativo nello *shortening* (Sahley et al., 1994; Modney et al., 1997). Esperimenti condotti su corde nervose isolate hanno dimostrato che il potenziamento della risposta di *shortening* che si ha durante la disabitudine è mimato dalla 5HT, mentre viene bloccato dalla metisergide (bloccante generico dei recettori serotoninergici) (Belardetti et al., 1982) e dalla deplezione della serotonina stessa (Ehrlich et al., 1992). Questo neurotrasmettitore agisce attraverso un aumento dei livelli intracellulari di cAMP (Wittenberg & Kristan, 1992). Anche nella disabitudine del riflesso di *local bending* è stato osservato il coinvolgimento di 5HT. In risposta ad una lieve stimolazione meccanica della cute, la sanguisuga produce una flessione locale del corpo contraendo i muscoli longitudinali del lato stimolato e rilassando quelli del lato opposto (Kristan, 1982; Lockery & Kristan, 1990; Lockery & Sejnowski, 1992).

Studi condotti sul modello comportamentale dell'induzione al nuoto, hanno fornito interessanti indicazioni sui meccanismi molecolari e cellulari alla base dell'abitudine, della sensitizzazione e della disabitudine. La stimolazione tattile della cute dell'animale produce in ciascun ganglio segmentale l'attivazione del circuito nervoso del nuoto. I primi studi sull'abitudine nel nuoto sono stati condotti su preparati "semi-intatti", nei quali segmenti della parete corporea venivano lasciati

connessi alla catena dei gangli segmentali (Debski & Friesen, 1985). La stimolazione ripetuta di uno dei segmenti di cute determinava una riduzione progressiva di ciascun evento di nuoto, fino ad arrivare ad una mancata risposta in corrispondenza delle zone di stimolazione. Il recupero della risposta avveniva spontaneamente dopo la sospensione della stimolazione, con un processo graduale che richiedeva circa 40 minuti (Debski & Friesen, 1985).

Nei nostri laboratori sono stati condotti studi di tipo comportamentale sull'abitudine, la sensitizzazione e la disabitudine nell'induzione al nuoto in sanguisughe pressoché intatte. In animali, in cui sia stato disconnesso il ganglio cefalico dal primo ganglio segmentale (in modo da eliminare l'inibizione tonica che il ganglio cefalico esercita sull'attività natatoria), stimoli tattili o lievi stimoli elettrici applicati sulla cute della porzione caudale dell'animale provocano un ciclo di nuoto con una latenza costante tra l'applicazione dello stimolo e l'inizio della risposta. Se questi stimoli vengono applicati con frequenza costante (1/min) inducono un aumento progressivo della latenza (abitudine) (Fig. 6)

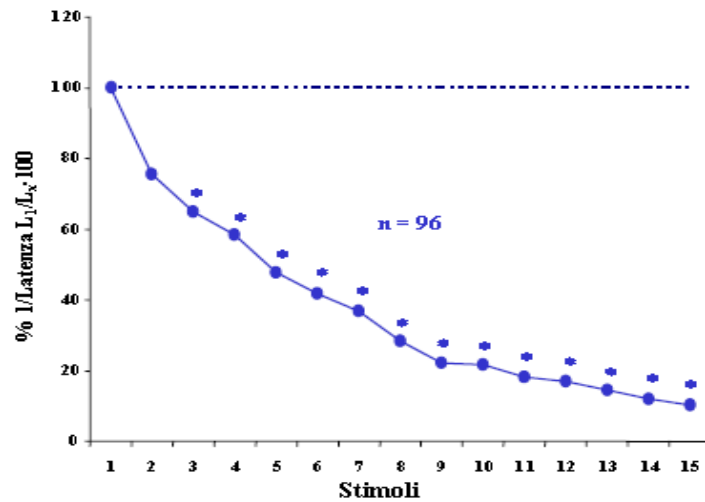


Fig. 6: Abitudine: in ascisse è riportata la successione temporale delle stimolazioni fornite agli animali, in ordinate l'inverso delle latenze normalizzate all'inverso della latenza misurata dopo la prima stimolazione. Dal grafico si nota come la stimolazione ripetuta induca un graduale decremento della risposta.

Allo scopo di analizzare l'importanza di un intervallo interstimolo (ITI) costante per ottenere un decremento significativo della risposta dell'animale, sono stati esaminati gli effetti della stimolazione elettrica ripetuta con differenti ITI: 30secondi (30 prove), 1minuto (30 prove), 2 minuti (30 prove). È stata riscontrata una maggiore riduzione della risposta comportamentale ad ITI di 1 minuto. (Fig. 7) Considerando l'entità della risposta al primo stimolo il 100%, dopo 10-15 prove si ha una riduzione al 10% circa. (Zaccardi et al., 2001)

L'applicazione di uno stimolo nocicettivo, rappresentato da 15 spazzolate fornite in senso postero-anteriore sulla cute dorsale dell'animale (*brushing*), provoca, invece, una repentina diminuzione della latenza, sia in risposte abituate (disabitudine) (Fig. 8A) che in risposte non abituate (sensitizzazione) (Fig. 8B) (Brunelli et al., 1997; Zaccardi et al., 2001).

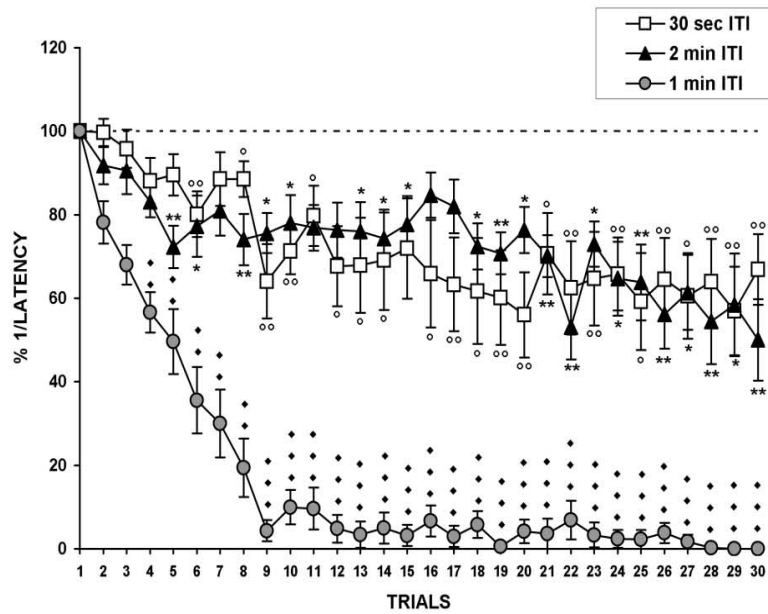


Fig. 7: Effetti della stimolazione elettrica ripetuta a differenti ITI: 30 sec, 2 min, 1 min. In ordinata è riportato l'inverso delle latenze normalizzate all'inverso della latenza misurata dopo la prima stimolazione, in ascissa le 30 prove eseguite. Dal grafico si osserva che si ha una riduzione significativa della risposta se la stimolazione viene effettuata ad ITI di 1min.

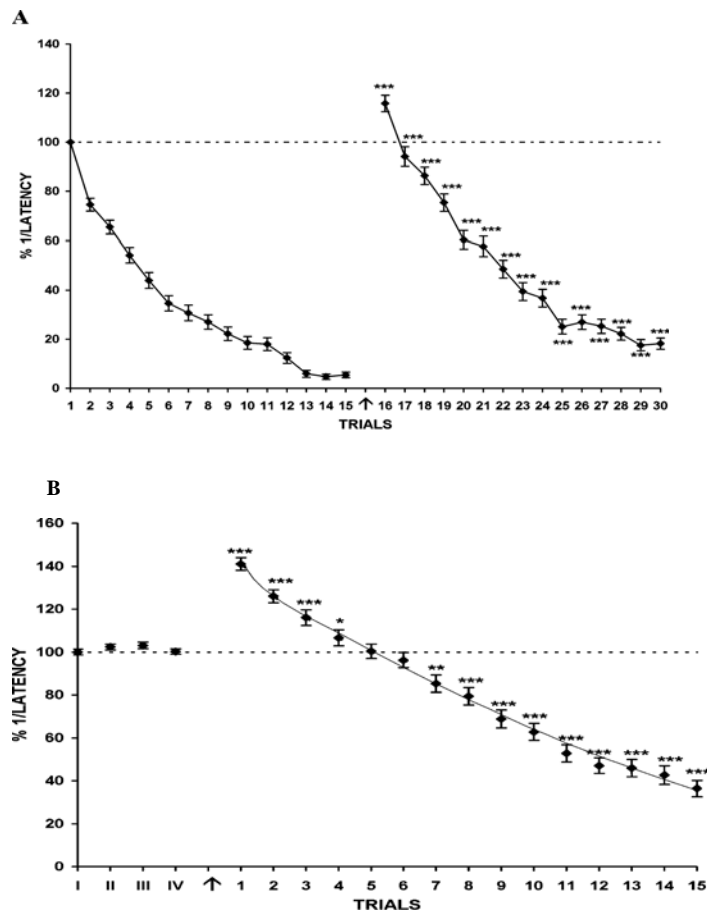


Fig. 8: Disabitudine (A) e sensibilizzazione (B): è evidente il potenziamento della risposta allo stimolo che segue immediatamente il brushing (freccia)

Studi condotti nei nostri laboratori hanno dimostrato il coinvolgimento dell'acido arachidonico e dei metaboliti della via 5-lipossigenasica nell'abitudine a breve termine dell'induzione al nuoto nella sanguisuga (Brunelli et al., 1996; Scuri et al., 1998). E' stato, inoltre, dimostrato che per l'instaurarsi del processo di abitudine è necessario un aumento dei livelli intracellulari di Ca^{2+} di provenienza sia intra- che extracellulare (Scuri et al., 1998; Brunelli et al., 1997).

Le modificazioni a breve termine che sono alla base della sensitizzazione e disabitudine, invece, vedono il coinvolgimento di 5HT.

A livello comportamentale 5HT è in grado di mimare la disabitudine e la sensitizzazione dell'induzione al nuoto (Fig. 9) (Zaccardi et al., 2004). L'applicazione di metisergide elimina il potenziamento osservato nella sensitizzazione e nella disabitudine (Zaccardi et al., 2004). E' emerso, inoltre, che la 5HT agisce attraverso la via di cAMP: l'uso di diversi inibitori dell'adenilato ciclasi, MDL 12.3330A e SQ22536, blocca l'instaurarsi della sensitizzazione e della disabitudine dell'induzione al nuoto (Zaccardi et al., 2004).

Questi processi possono essere bloccati anche dalla somministrazione di H-7 (un inibitore generico delle protein chinasi) o di un inibitore selettivo per PKA (Myrostoilated PKA inhibitor).

Nel loro insieme i dati raccolti nella sanguisuga mostrano, in analogia con altri modelli sperimentali, il coinvolgimento di 5HT nei processi BT di sensitizzazione e disabitudine. 5HT attraverso l'aumento dei livelli di cAMP porta all'attivazione di PKA. (Zaccardi et al., 2004).

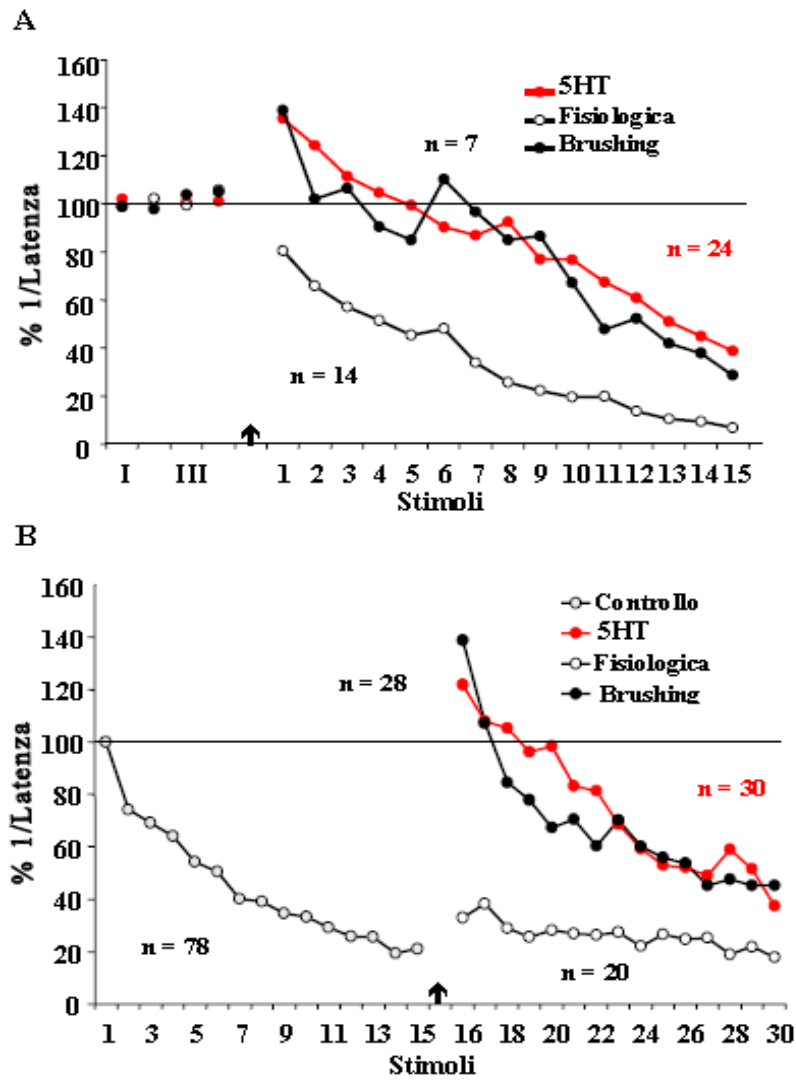


Fig. 9: Sensitizzazione (A) e disabitudine (B) indotte da 5HT 200 μ M. In entrambi i casi le curve degli animali trattati con 5HT (cerchi rossi) risultano del tutto sovrapponibili a quelle relative agli animali trattati con il *brushing* (cerchi neri). (Modificata da: Zaccardi et al., 2004).

2. SCOPO DELLA TESI

I risultati di studi sperimentali condotti su differenti modelli animali, compreso l'uomo, suggeriscono che ogni forma di memoria è caratterizzata da processi che si attuano a breve termine (BT) e da processi che inducono una stabilizzazione della memoria a lungo termine (LT). Studi molecolari sulle forme implicite ed esplicite di apprendimento suggeriscono che vi sia una fase di transizione tra breve e lungo termine caratterizzata da sintesi ex novo di proteine. In questo modo un processo transitorio, che comporta la modificazione covalente di proteine preesistenti quale la fosforilazione proteica che caratterizza l'apprendimento BT, si trasforma in un processo stabile di autoconservazione che si accompagna alla formazione di nuove connessioni sinaptiche (Glanzman et al., 1990).

In letteratura esistono evidenze in questo senso. In *Aplysia* studi molecolari hanno evidenziato un ruolo fondamentale nel passaggio ad apprendimento LT di proteine coinvolte: nel rimodellamento sinaptico (Barzilai et al., 1992; Hu et al., 1993; Noel et al., 1993), nel trasporto assonale, (Noel et al., 1993); nei processi di segnalazione intracellulare (Proteina 1 simile alla calmodulina (CaM) 17 kDa, Zwartjes et al., 1998) nella glicolisi (fosfoglicerato chinasi 43,670 kDa , Zwartjes et al., 1998)

La ricerca sui meccanismi dell'apprendimento non associativo a lungo termine a tutt'oggi non può considerarsi conclusa. In questo lavoro di tesi è stato utilizzato il modello sperimentale della sanguisuga *H. medicinalis*, che si è dimostrato particolarmente utile per gli studi neurobiologici, per a) individuare protocolli di addestramento che inducessero

apprendimento LT, e b) iniziare uno studio che possa portare all'individuazione del *pattern* di proteine coinvolte nell'apprendimento LT in questo anellide.

Il lavoro sperimentale si è posto i seguenti obiettivi:

1. individuare un protocollo di abitudine e sensitizzazione LT nel modello comportamentale dell'induzione al nuoto;
2. verificare il ruolo fondamentale della sintesi ex novo di proteine nell'istaurarsi dei processi LT mediante inibizione della sintesi proteica con cicloesimide;
3. ottenere un preparato di tessuto da sottoporre, in seguito, ad indagine biologico-molecolare.

3. MATERIALI E METODI

3.1 ANIMALI

Sono state utilizzate sanguisughe adulte (di 10 mesi circa) della specie *Hirudo medicinalis* fornite dalla ditta Ricarimpex (Eysines, Francia).

Gli animali sono stati mantenuti in ambiente termostato alla temperatura di 16° C, all'interno di recipienti ben areati contenenti acqua oligominerale "Panna" (secondo le indicazioni della ditta fornitrice) e sottoposte al ritmo giornaliero luce-buio.

Due giorni prima dell'inizio dell'addestramento, gli animali sono stati sottoposti ad intervento microchirurgico per disconnettere il ganglio cefalico dal primo ganglio segmentale (Fig. 10). L'operazione è stata eseguita con bisturi per la chirurgia oftalmica dopo aver anestetizzato gli animali in etanolo al 10% in acqua di fonte per 10 minuti e averli fissati in una vaschetta di paraffina con il ventre rivolto verso l'alto. Tale procedura consente di eliminare l'inibizione tonica esercitata dal ganglio cefalico sul nuoto e far sì che, ad ogni stimolazione, l'animale risponda con un ciclo di nuoto. Per tutto il tempo dell'operazione gli animali venivano mantenuti immersi in soluzione fisiologica (per la composizione vedi sotto).

Il taglio veniva successivamente suturato con filo da sutura SETA (Ethicon).

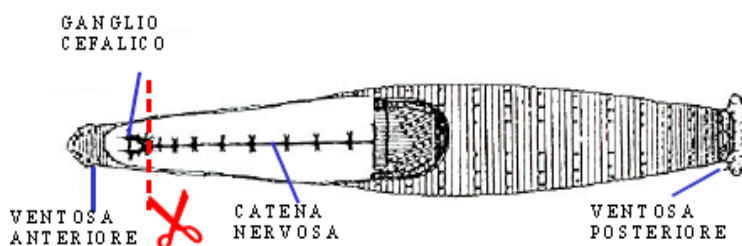


Fig. 10: Disegno schematico di *Hirudo medicinalis*. illustrante il livello della sezione chirurgica effettuata sugli animali. Spiegazione nel testo

Nel corso dell'intervento è stato inserito, nella ventosa caudale, un filo di cotone, così da poter fissare l'animale al *set-up* di registrazione.

3.2PROCEDURA COMPORTAMENTALE

Per indurre il nuoto, che rappresenta il modello comportamentale utilizzato nei nostri esperimenti, l'animale è stato posto in una vaschetta di *plexiglass* dotata di un supporto di paraffina, riempita di acqua Panna (utilizzata anche per la stabulazione degli animali), in modo che la ventosa caudale poggiasse su un elettrodo bipolare attraverso il quale all'animale veniva fornito un lieve stimolo elettrico che ha rappresentato lo stimolo test. L'elettrodo costituito da 2 fili di argento clorurato era collegato ad un'unità di stimolazione isolata (SIU) connessa ad un sistema computerizzato di stimolazione e registrazione che consente di impostare il voltaggio di stimolazione e mediante un dispositivo ON/OFF di dare inizio alla stimolazione e al conteggio del tempo (ON) e di bloccare quest'ultimo (OFF) quando l'animale comincia a nuotare (Fig. 11). Si considera che l'animale inizia a nuotare quando flette il corpo in senso dorso-ventrale generando un'onda di deflessione che corre dalla porzione caudale a quella cefalica.

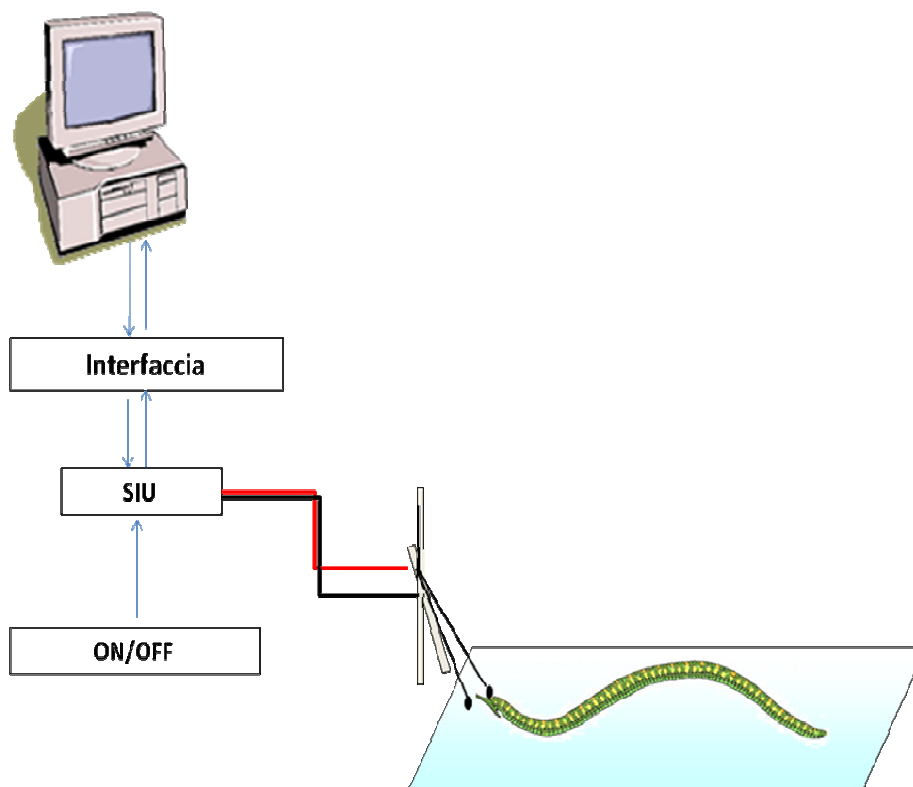


Fig. 11: Illustrazione schematica dell'apparato di registrazione.
Spiegazione nel testo.

L'animale era fissato alla paraffina tramite il filo di cotone inserito nella ventosa caudale in modo da poter nuotare senza allontanarsi dall'elettrodo.

Lo stimolo test consisteva di un treno della durata complessiva di 1,6 sec costituito da impulsi quadri della durata di 5 msec a frequenza di 8,3 Hz. L'intensità di stimolazione, scelta per ogni animale, era quella minima in grado di indurre un ciclo di nuoto e corrispondeva ad un voltaggio soglia, solitamente compreso tra 0,8V a 1,4V. Tale voltaggio era mantenuto costante per tutta la durata dell'esperimento. Lo sperimentatore, attraverso il dispositivo ON/OFF, attivava la stimolazione elettrica mentre un *timer* misurava il tempo che intercorreva tra l'applicazione dello stimolo e l'inizio dell'attività natatoria (L, latenza); osservando direttamente la sanguisuga, mediante il tasto OFF l'operatore

bloccava il timer nel momento in cui l'animale incominciava a nuotare. Mediante un *software* (*Measure 1.1.0*) opportunamente costruito, si acquisiva in tempo reale la misura in secondi della latenza.

La variazione della latenza è considerato un buon indice per descrivere l'instaurarsi dei processi di apprendimento nell'induzione al nuoto. Infatti, si ha abitudine quando si registra un progressivo aumento della latenza in risposta all'applicazione ripetuta ad intervalli costanti dello stimolo test, mentre si ha sensitizzazione quando la latenza allo stimolo test si riduce in seguito all'applicazione di uno stimolo nocicettivo.

Seguendo il protocollo di Zaccardi et al., (2001) l'abitudine a breve termine è stata indotta fornendo 15 stimoli test ad intervalli costanti di 1 min.

Per ottenere abitudine a lungo termine gli animali sono stati sottoposti per 6 giorni consecutivi ad una sessione quotidiana di abitudine a breve termine.

Per indurre sensitizzazione sono stati forniti inizialmente 4 stimoli test ad intervalli di tempo *random* (in modo da non indurre abitudine) per individuare la risposta basale di ogni animale rappresentata dalla media delle latenze registrate dopo i 4 stimoli (L_m); quindi è stato fornito lo stimolo nocicettivo rappresentato da 15 spazzolate (1/sec) (*brushing*) applicate sul dorso dell'animale, seguite dall'applicazione di 3 stimoli test ad intervalli di 5 minuti.

Per ottenere sensitizzazione a lungo termine, gli animali sottoposti ad una sessione di sensitizzazione il 1° giorno, hanno ricevuto poi per 5 giorni consecutivi quotidianamente una stimolazione nocicettiva rappresentata da una serie di 15 spazzolate ripetuta per 4 volte a distanza di 10 minuti, e il 6°

giorno nuovamente una sessione di sensitizzazione.

3.3 ESTRAZIONE DI PROTEINE DA TESSUTO NERVOSO GANGLIARE

Le proteine sono state isolate dai gangli segmentali e dal ganglio caudale di animali sensitizzati a lungo termine e animali di controllo. Tre catene nervose sono state sonicate con un sonicatore (*Vibra cell Sonic materials*), immediatamente dopo essere state immerse in 200 µl di soluzione fisiologica contenente un cocktail di inibitori delle proteasi avente la seguente composizione: leupeptina 10 µg/ml, pepstatina A 1 µg/ml, aprotinina 2 µg/ml, PMSF 1mM, ortovanadato di sodio 1 mM, fluoruro di sodio 10 mM, inibitore delle proteasi per la tripsina e la plasmina 10 µg/ml.

L'omogenato ottenuto è stato incubato a temperatura ambiente per 15 minuti e poi centrifugato (*centrifuge BR4i Jouan*) a 4°C per 15 minuti a 12000 rpm per ottenere una divisione fisica in precipitato (*pellet*) e surnatante. Sia il surnatante che il *pellet* sono stati recuperati. Le proteine contenute nel *pellet* e nel surnatante sono state quantizzate utilizzando il *Biorad Protein Assay* (Bio-Rad). I campioni sono stati conservati a -80°C per le analisi successive.

3.4 ELETTROFORESI SDS-PAGE

SDS-PAGE è l'acronimo di *Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, cioè elettroforesi su gel di poliacrilamide in presenza di sodio dodecil solfato.

La tecnica consiste nel separare in un campo elettrico le proteine dopo averle denaturate e caricate negativamente in modo uniforme con SDS, ridotte con β -mercaptoetanolo e riscaldate a 100°C per 5 minuti; in questo modo la separazione delle proteine su gel avviene esclusivamente in base al diverso peso molecolare. L'SDS è un detergente fortemente ionico che denatura le proteine legandosi al lato idrofobico della catena, così da destabilizzare le interazioni idrofobiche nel cuore della proteina, responsabili della stabilità della conformazione. Il sodio dodecil solfato conferisce inoltre una carica elettrica negativa in media ogni 2 residui di amminoacidi. Le proteine trattate con SDS sono denaturate e presentano un numero di cariche proporzionale al loro peso molecolare.

Le proteine del *pellet* e del surnatante sono state trattate con SDS e fatte correre attraverso le maglie di un gel di poliacrilamide al 12 % avente uno spessore di 0,75 mm ottenuto con: 1.6 ml di H₂O distillata; 2 ml di soluzione di acrilammide (30% acrilammide e 0,8% bisacrilammide); 1,3 ml di TRIS-HCl pH 8,8 1,5M; 50 μ l SDS 10%; 50 μ l di APS 10%; 2 μ l TEMED. La parte superiore del gel, *stacking gel*, avente la funzione di concentrare il campione proteico caricato nei pozzetti, in modo che tutti i campioni cominciassero la loro migrazione dallo stesso punto di partenza, aveva invece la seguente composizione: 550 μ l di H₂O distillata; 170 μ l di soluzione di acrilammide, (30% acrilammide e 0,8% bisacrilammide); 260 μ l di TRIS-HCl pH 6,8 0,5M; 10 μ l

di SDS 10%; 10 µl di APS 10%; 2µl TEMED.

Al fine di ottenere una carica negativa omogenea, a ciascun campione di proteine sono stati aggiunti 5 µl di *Sample Buffer 5X* (0,0625 M TRIS pH 6,8, 2% SDS, 5% β-mercaptoetanolo, 10% glicerolo, 0,02% di Blu di Bromofenolo) scaldati a 100°C per 5 minuti.

Nel gel sono stati caricati 40 µg di proteine per ciascun pozzetto e un marker (*ColorPlus Prestained Protein Marker BioLabs*) di peso molecolare noto per monitorare la corsa elettroforetica.

La corsa elettroforetica è stata eseguita nell'apposito sistema *BioRad mini protean III system* fornito di un alimentatore in grado di erogare corrente continua a potenza costante e voltaggi elevati. La camera per la corsa elettroforetica è stata riempita con *electrode buffer* (3 g di TRIS, 1 g SDS, 14,14 g di glicina per litro di soluzione) e la corsa è stata effettuata con corrente di 200 V. Al termine della separazione elettroforetica (circa un'ora) il gel è stato colorato con *Silver stain kit Bio-Rad* e *Bio-Safe Coomassie* (0,02% Blu di Coomassie in 50% di metanolo) e poi decolorato con metanolo al 50%. La quantizzazione del volume delle bande proteiche è stata effettuata con il programma *Quantity one* della Biorad.

3.5 SOSTANZE

La soluzione fisiologica utilizzata era così composta: NaCl 115 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 1,8 mM, glucosio 10 mM, tamponata a pH 7,4 con TRIS-maleato.

Tutte le sostanze utilizzate erano della Sigma-Aldrich. Come inibitore della sintesi proteica è stata utilizzata la cicloesimide (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) alla concentrazione di 10^{-3} M; l'inibitore è stato iniettato negli animali disciolto in soluzione fisiologica mediante due iniezioni, una a livello caudale e l'altra a livello rostrale, di un volume di soluzione pari a 100 μ l/g di peso corporeo

Gli animali di controllo sono stati iniettati con le stesse modalità con soluzione fisiologica.

3.6 ANALISI DEI DATI

Tutti i dati sono stati riportati come medie \pm E.S.

Nel nostro modello sperimentale, durante l'abitudine si ha un aumento della latenza. In accordo con la definizione di abitudine, per poter descrivere il processo come decremento della risposta comportamentale sono stati costruiti grafici nei quali sull'asse delle ordinate è riportato l'inverso della latenza ($1/L$) misurata dopo ogni stimolo normalizzato all'inverso della latenza misurata dopo il primo stimolo, e sull'asse delle ascisse viene indicata la successione temporale delle stimolazioni.

Durante la sensitizzazione è stato misurato un decremento delle latenze rispetto alla latenza media. Per descrivere la sensitizzazione come incremento della risposta comportamentale sono stati costruiti grafici nei quali in ordinate è stato riportato l'inverso delle latenze normalizzato all'inverso della latenza media calcolata sugli iniziali 4 stimoli test ($1/L_M$) secondo la

formula $L_1 / L_x \times 100$, dove L_x è la latenza relativa ad ogni stimolazione fornita dopo lo stimolo nocicettivo.

Le variazioni delle latenze in secondi sono state analizzate con il test ANOVA per misure ripetute a due vie per mettere in evidenza differenze significative tra le curve ottenute il 1° e il 6° giorno e con il *Tukey post-hoc test* e il *Fisher post-hoc test* per individuare nella sequenza di stimoli le risposte effettivamente differenti nelle due curve. L'analisi statistica è stata effettuata mediante il software *Statistica* (Statsoft, Tulsa, USA).

L'analisi statistica dei volumi delle bande di proteine è stata effettuata tramite *Unpaired t test*, con il software *Prism* (GraphPad, Software Inc., USA).

4. RISULTATI

4.1 ABITUDINE A LUNGO TERMINE IN *H. medicinalis*

Sanguisughe con il primo ganglio segmentale disconnesso dal ganglio cefalico sono state sottoposte ad una tipica sessione di abitudine costituita da 15 stimoli test applicati ad intervalli interstimolo costanti di 1 minuto. Nei 5 giorni successivi, 42 animali (gruppo sperimentale) sono stati sottoposti a sessioni di abitudine giornaliere, mentre 39 animali (gruppo di controllo) sono stati tolti dal termostato e lasciati a temperatura ambiente per la durata di una singola seduta di abitudine.

Il 6° giorno entrambi i gruppi sono stati sottoposti ad una tipica seduta di abitudine. All'interno di ciascun gruppo sono state paragonate le latenze registrate il 1° giorno vs le latenze registrate il 6° giorno. Il test ANOVA per misure ripetute a due vie ha mostrato che, considerando le 15 prove (trials) a cui sono stati sottoposti gli animali, il gruppo sperimentale è andato incontro ad abitudine (aumento progressivo della latenza) sia il 1° che il 6° giorno ($F_{14,82} = 20,771$, $p < 0,0001$). Infatti, il *Fisher post hoc test* ha indicato che il 1° giorno si ha aumento delle latenze statisticamente significativo a partire dal 4° stimolo ($p < 0,05$) mentre il 6° giorno a partire dal 2° stimolo ($p < 0,01$) (Fig. 12A).

L'analisi tra gruppi, ha mostrato che le curve descritte il 1° e il 6° giorno differiscono significativamente nei primi 6 punti ($F_{1,82} = 31,650$, $p < 0,0001$; *Fisher post hoc test*, $p < 0,05$). Ciò dimostra che c'è stata abitudine LT. Negli animali di controllo (Fig. 12B),

l'analisi statistica effettuata tramite il test ANOVA per misure ripetute ha mostrato che c'è stata abitudine sia il 1° che il 6° giorno ($F_{14,37} = 39,507$, $p < 0,0001$) a partire dal 4° stimolo (*Fisher post hoc test*, $p < 0,01$), mentre l'analisi tra gruppi ha mostrato che le curve descritte il 1° e il 6° giorno non differiscono significativamente ($F_{1,37} = 0,220$, $p = 0,639$), dimostrando che non si è avuta abitudine LT.

Sono stati presi in esame altri due gruppi di animali: un gruppo ($n = 11$) è stato sottoposto quotidianamente per 6 giorni a 15 stimolazioni con intervalli interstimolo *random* definiti da tabelle costruite tra 30 secondi e 2 minuti, con differenze di almeno 15 secondi, (gruppo sperimentale) (Fig. 13A) mentre l'altro gruppo è stato sottoposto a stimolazioni con intervalli interstimolo *random* (come sopra definiti) soltanto il 1° e il 6° giorno, mentre nei giorni intermedi sono stati tolti dal termostato e lasciati a temperatura ambiente per la durata di una singola seduta di addestramento (gruppo di controllo, $n = 7$) (Fig. 13B). Le latenze registrate nel gruppo degli animali sperimentali nel corso delle 15 prove sia il 1° sia il 6° giorno sono risultate non significativamente differenti tra loro indicando che non c'è stata abitudine né il 1° né il 6° giorno (per prove $F_{14,10} = 1,250$, $p = 0,238$; tra gruppi $F_{1,10} = 0,257$, $p = 0,61$).

Anche gli animali di controllo non hanno mostrato abitudine né il 1° né il 6° giorno: infatti sia l'analisi statistica riferita alle prove ($F_{14,6} = 0,842$, $p = 0,622$) sia l'analisi tra gruppi ($F_{1,6} = 0,13$, $p = 0,72$) ha mostrato che non ci sono differenze significative tra le latenze nel 1° e nel 6° giorno e tra il 1° e il 6° giorno.

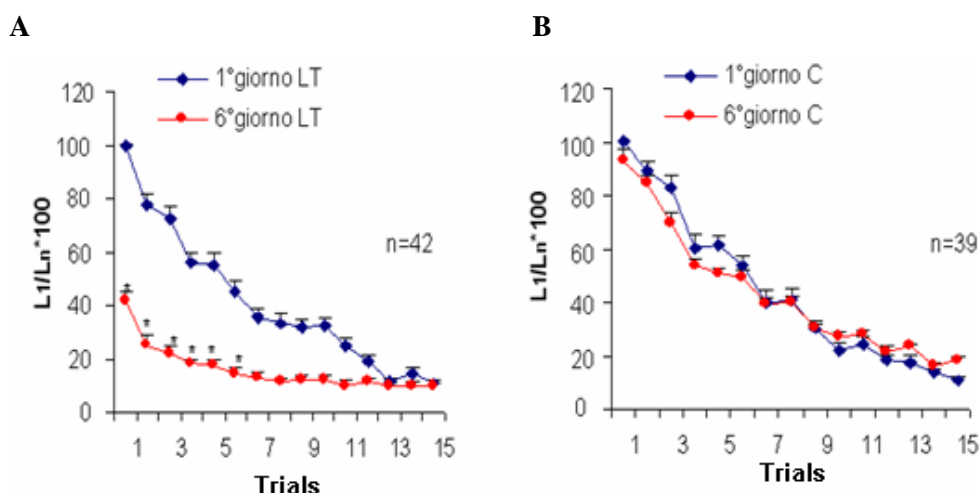


Fig. 12: Abitudine a lungo termine. In questo e in tutti i grafici successivi sono riportati i valori medi + E.S. dell'inverso delle latenze normalizzate all'inverso della latenza registrata dopo il primo stimolo del 1° giorno. **A:** Gli animali sperimentali mostrano una progressiva riduzione della risposta allo stimolo test sia il 1° (●) sia il 6° giorno (●) e il 6° giorno anche le latenze ai primi 6 stimoli risultano significativamente più lunghe rispetto al 1° giorno. **B:** Gli animali di controllo mostrano una riduzione progressiva delle risposte sia il 1° (●) sia il 6° (●) giorno e le due curve non differiscono significativamente tra di loro. * indica $p < 0,05$, ANOVA per misure ripetute a due vie e Fisher post-hoc test tra gruppi.

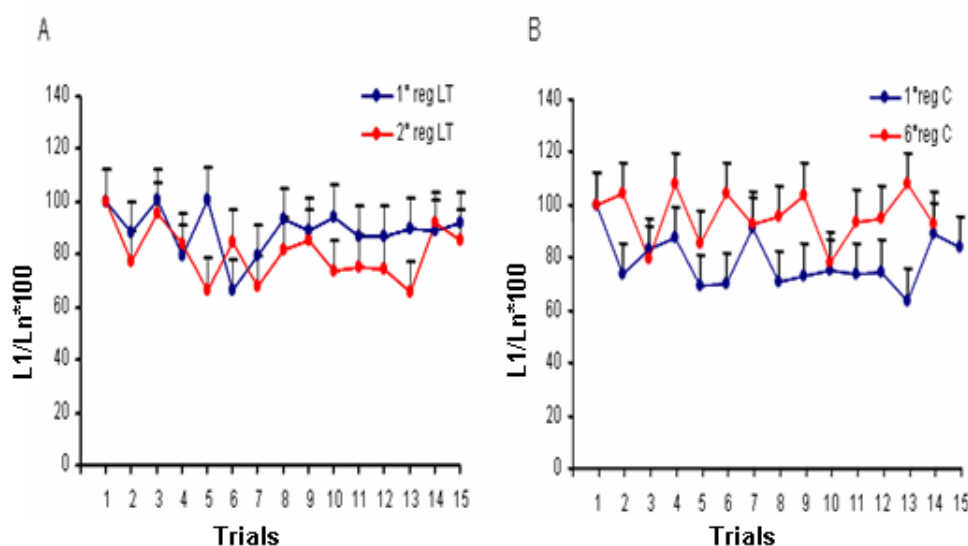


Fig. 13: Addestramento con stimoli applicati ad intervalli random Sono riportate nel grafico le latenze registrate il 1° giorno (●) e le latenze registrate il 6° giorno (●). Sia negli animali sperimentali (**A**) sia negli animali di controllo (**B**) non si ha abitudine ne' a breve ne' a lungo termine

4.2 SENSITIZZAZIONE A LUNGO TERMINE IN *H. medicinalis*

Un gruppo di animali (gruppo sperimentale, $n = 18$) è stato sottoposto ad una sessione di sensitizzazione il 1° giorno e per i 5 giorni successivi a quotidiane stimolazioni nocicettive (per il protocollo sperimentale vedi materiali e metodi) seguite il 6° giorno da una sessione di sensitizzazione, mentre 8 animali (gruppo di controllo) hanno subito il 1° e il 6° giorno una seduta di sensitizzazione e quotidianamente sono stati tolti dal termostato e lasciati a temperatura ambiente per la durata di una seduta di stimolazione nocicettiva. In ogni seduta di sensitizzazione è stata valutata la risposta basale come latenza media (Lm) ottenuta dalla medie delle latenze registrate dopo la presentazione di 4 stimoli test applicati ad intervalli interstimolo non costanti e compresi tra 30 secondi e 5 minuti per evitare di indurre abitudine, e le risposte a 3 stimoli test applicati dopo stimolazione nocicettiva a distanza di 5 minuti l'uno dall'altro. Il confronto tra le latenze registrate il 1° e il 6° giorno all'interno di ciascun gruppo di animali, ha indicato che gli animali sperimentali hanno fatto registrare una riduzione delle 3 latenze dopo stimolazione nocicettiva rispetto a Lm statisticamente significativa sia il 1° sia il 6° giorno (Anova per misure ripetute, per prove $F_{3,17} = 100,13$, $p < 0,0001$, , *post hoc Tukey test* $p < 0,05$), mentre l'analisi tra gruppi ha evidenziato una differenza significativa tra l'andamento delle latenze registrate il 1° giorno rispetto a quelle registrate il 6° giorno ($F_{1,17} = 5,975$, $p = 0,0229$) sebbene Lm non sia risultata variata nei due giorni (Fig. 14A, *post hoc Tukey test*, $p > 0,05$).

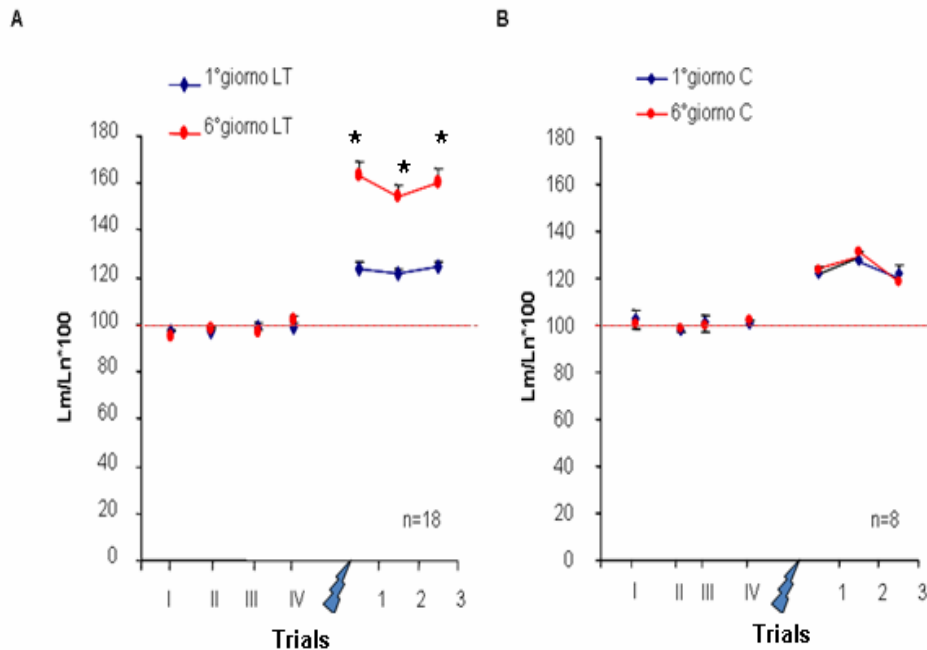


Fig. 14: Sensitizzazione LT. I grafici mostrano i valori medi + E.S. dell'inverso delle latenze normalizzate all'inverso della latenza media registrata ciascun giorno. I primi 4 valori rappresentano le risposte misurate ai 4 stimoli test applicati ad intervalli *random*. La media di tali latenze (linea tratteggiata) rappresenta la latenza media. **A:** Gli animali sperimentali mostrano sia il 1° (●) che il 6° (●) giorno di addestramento un potenziamento della risposta dopo stimolazione nocicettiva (🔪). Tale potenziamento risulta essere maggiore il 6° giorno rispetto al 1°. **B:** Gli animali di controllo mostrano un potenziamento della risposta dopo stimolazione nocicettiva del tutto paragonabile nei due giorni considerati. * *Tukey test* $p < 0,05$

Ciò indica che c'è stato un potenziamento della risposta allo stimolo test differente nei due giorni considerati. Per evidenziare l'incremento della risposta dopo stimolazione nocicettiva sono state considerate le differenze tra la latenza media e le latenze registrate dopo stimolazione nocicettiva: come mostrano gli istogrammi di figura 15A, l'incremento della risposta allo stimolo test è risultata significativamente maggiore il 6° giorno rispetto al 1° ($F_{1,17}=15,83$; $p<0,001$) indicando che c'è stata sensitizzazione LT. Gli animali di controllo hanno mostrato riduzione significativa delle latenze allo stimolo test dopo stimolazione nocicettiva rispetto a Lm in entrambi i giorni (per prove $F_{3,7}=37,689$, $p < 0,0001$) (Fig. 14B) ma l'entità di tale variazione si è

mantenuta costante come mostrano le figure 14B e 15B. Pertanto, negli animali di controllo non si è avuto apprendimento LT.

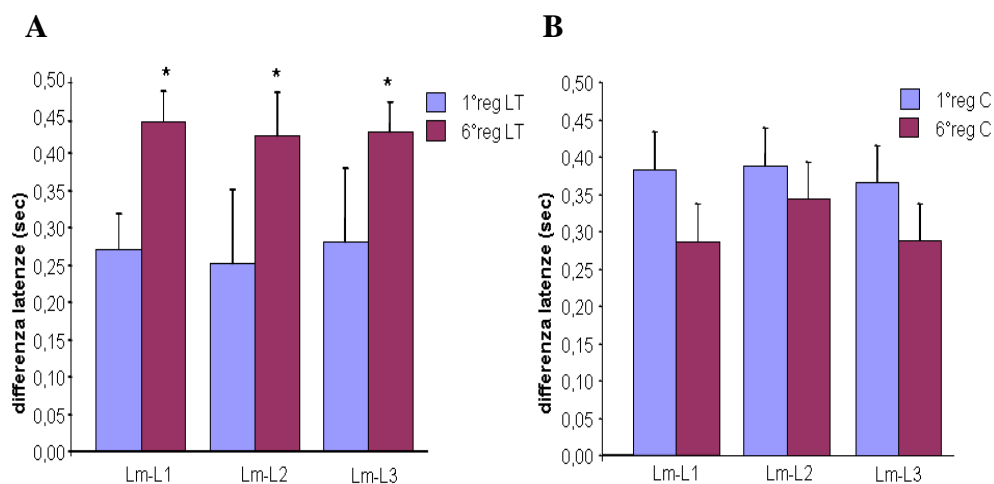


Fig. 15: Entità della sensitizzazione. Gli istogrammi mostrano le differenze espresse in secondi + E.S. tra Lm e la latenza misurata ai 3 stimoli successivi allo stimolo nocicettivo **A**: Negli animali sperimentali, le differenze calcolate per il giorno 6° sono risultate significativamente maggiori rispetto al 1° giorno **B**: Negli animali di controllo tali differenze calcolate il 1° e il 6° giorno sono comparabili. * indica $p < 0,001$

4.3 EFFETTI DELLA CICLOESIMIDE SULL'APPRENDIMENTO A LUNGO TERMINE

Una volta messo a punto il protocollo di addestramento, al fine di verificare se nell'apprendimento LT sia coinvolta la sintesi di proteine, sono stati condotti esperimenti nei quali agli animali è stata somministrata cicloesimide.

La cicloesimide (nota anche come actidione), è un antibiotico prodotto dagli *Streptomyces griseus*, *nausei*, *naraenisis*, che impedisce l'attacco iniziale dell'mRNA ai ribosomi della struttura polisomica; è probabile che questo antibiotico inibisca la peptidil-transferasi della subunità 60S del ribosoma.

Nonostante sia stato osservato che la cicloesimide può risultare tossica per molti Vertebrati, negli Invertebrati è stato rilevato solo un tasso minimo di tossicità.

Opportuni dosaggi proteici hanno dimostrato che nel sistema nervoso di sanguisughe iniettate con cicloesimide 10^{-3}M , con quantitativo pari a 100 $\mu\text{l/g}$ di peso somministrato in due volte, per 6 giorni consecutivi, l'inibizione della sintesi proteica risulta essere approssimativamente del 69%.

Nel corso degli esperimenti condotti non sono stati evidenziati negli animali effetti tossici imputabili al trattamento con questa sostanza.

4.4 EFFETTI DELLA CICLOESIMIDE SULL'ABITUDINE A LUNGO TERMINE

Due gruppi di animali sono stati sottoposti ad abitudine LT. Al termine di ogni seduta quotidiana di addestramento, un gruppo (gruppo sperimentale, $n = 11$), a partire dal 1° giorno, ha ricevuto cicloesimide 10^{-3} M somministrata 5 minuti dopo la seduta di abitudine (vedi materiali e metodi); il secondo gruppo (gruppo di controllo, $n = 11$) è stato iniettato con soluzione fisiologica.

Sono state paragonate le medie delle latenze registrate il 1° e il 6° giorno all'interno di ciascun gruppo di animali.

Mentre il gruppo di controllo ha mostrato l'instaurarsi di abitudine LT, indicata da una riduzione progressiva statisticamente significativa della risposta ($F_{14,10} = 15,9681$, $p < 0,0001$ per prove) nell'ambito di ciascuna curva riportata in Fig. 16B e da una differenza significativa tra le due curve ($F_{1,10} = 15,9622$, $p = 0,000711$ per gruppi), negli animali sperimentali c'è stata una riduzione della risposta sia il 1° giorno sia il 6° giorno ($F_{14,10} = 4,3735$, $p < 0,0001$ per prove) e le due curve non si discostano tra di loro in modo significativo ($F_{1,10} = 0,773$; $p < 0,69$) (Fig. 16A) indicando che l'iniezione dell'inibitore ha bloccato l'instaurarsi di apprendimento LT.

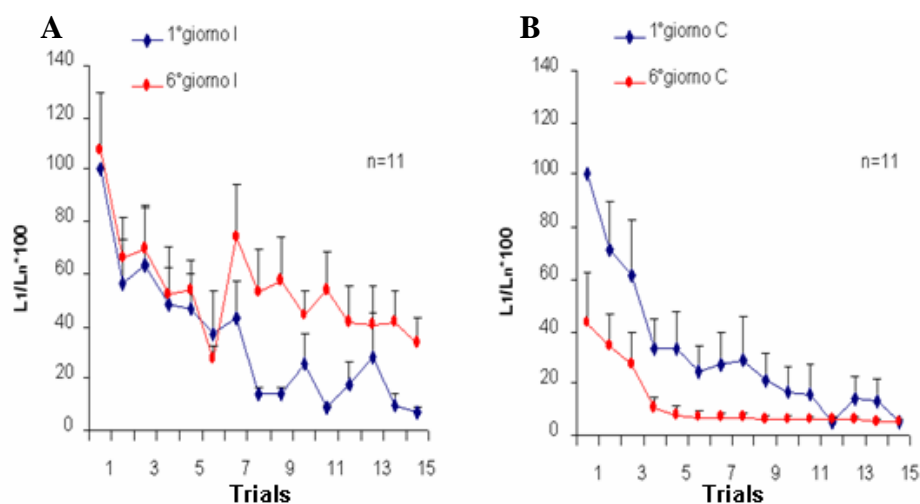


Fig. 16: Effetti della cicloesimide sull'abitudine LT

I grafici mostrano i valori medi + E.S. dell'inverso delle latenze normalizzate all'inverso della latenza registrata dopo il primo stimolo del 1° giorno. Sono riportate nel grafico le risposte registrate il 1° giorno (●), e quelle registrate il 6° giorno (●). **A:** Le curve che descrivono l'andamento delle latenze negli animali sperimentali il 1° e il 6° giorno non differiscono significativamente. **B:** Negli animali di controllo si è registrata una progressiva riduzione della risposta sia il 1° sia il 6° giorno, ma le due curve mostrano andamenti differenti.

4.5 EFFETTI DELLA CICLOESIMIDE SULLA SENSITIZZAZIONE A LUNGO TERMINE

Sono stati utilizzati due gruppi di animali: uno sperimentale ($n = 7$), l'altro di controllo ($n = 6$). Entrambi i gruppi sono stati sottoposti a sensitizzazione LT secondo il protocollo precedentemente descritto. Al termine di ogni seduta di stimolazione nocicettiva, il gruppo sperimentale, a partire dal 1° giorno, ha ricevuto cicloesimide 10^{-3} M somministrata, 5 minuti dopo la seduta di sensitizzazione (vedi materiali e metodi), mentre il gruppo di controllo è stato iniettato con soluzione fisiologica.

Sono state paragonate le medie delle latenze registrate il 1° e il 6° giorno all'interno di ciascun gruppo. Dall'analisi statistica effettuata tramite il test ANOVA per misure ripetute è risultato che nel gruppo degli animali sperimentali si è registrata una differenza significativa nell'andamento delle latenze del 1° giorno rispetto al 6° giorno ($F_{1,6} = 4,883$, $p = 0,0472$): il *Tukey post hoc* test ha evidenziato che c'è stata una riduzione della latenza dopo stimolazione nocicettiva rispetto a Lm statisticamente significativa il 1° ($p = 0,000132$), mentre il 6° giorno le latenze dopo stimolazione nocicettiva non hanno mostrato alcuna differenza statisticamente significativa rispetto a Lm ($p = 1$). Ciò indica che c'è stata sensitizzazione a breve termine il 1° giorno, ma l'iniezione di cicloesimide ha inibito la formazione di sensitizzazione LT (Fig. 17A). Confrontando gli istogrammi di figura 18, costruiti come in figura 15, con gli istogrammi di figura 15A, si osserva che il trattamento con

cicloesimide non solo non induce sensitizzazione LT ma determina una riduzione statisticamente significativa ($F_{1,6} = 21,98$; $p < 0,001$) delle differenze tra Lm e le latenze registrate successivamente alla stimolazione nocicettiva, indicando che è stata bloccata anche la sensitizzazione a breve termine.

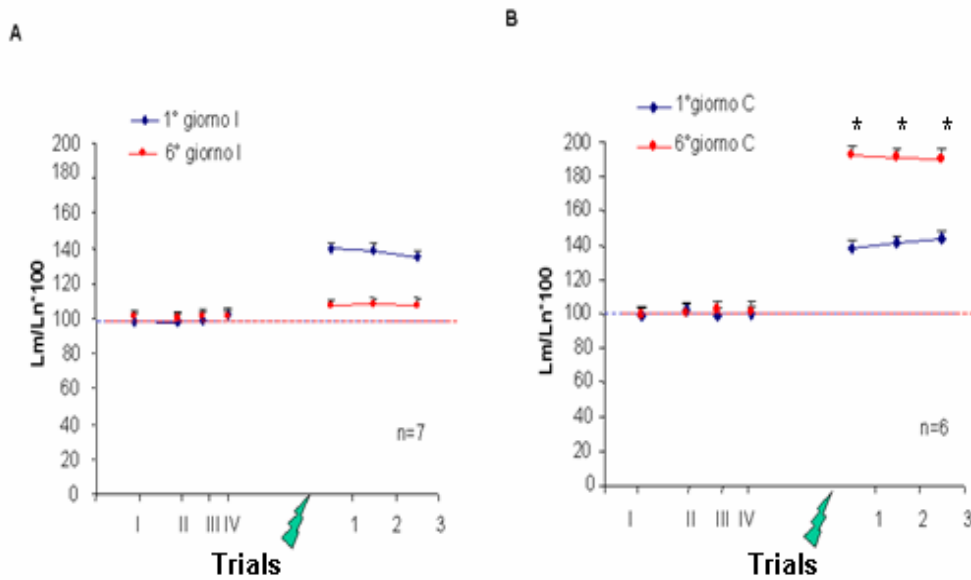


Fig. 17: Effetti della cicloesimide sulla sensitizzazione LT

I grafici mostrano i valori medi + E.S. dell'inverso delle latenze normalizzate all'inverso della latenza media registrata ciascun giorno. Sono riportate nel grafico le risposte registrate il 1° giorno (●), e quelle registrate il 6° giorno (●) **A:** Gli animali sperimentali mostrano il 1° giorno un netto potenziamento della risposta dopo stimolazione nocicettiva, mentre il 6°giorno dopo stimolazione nocicettiva non si ha incremento della risposta. **B:** Gli animali di controllo mostrano sia il 1° che il 6° giorno un potenziamento della risposta dopo stimolazione nocicettiva che risulta essere maggiore il 6° giorno rispetto al 1°.* indica $p < 0,05$ Tukey post hoc

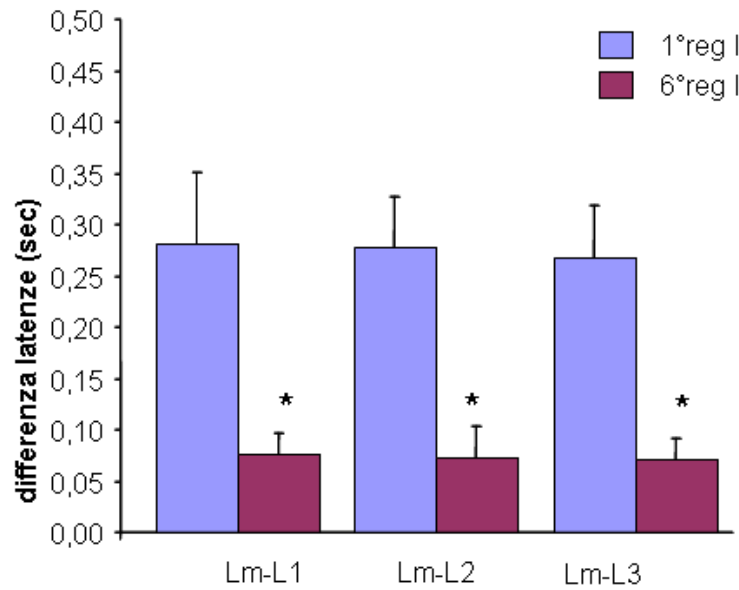


Fig. 18: L'istogramma rappresenta l'entità della sensitizzazione. Negli animali iniettati con cicloesimide, confrontando la differenza tra Lm e la latenza misurata ai 3 stimoli successivi allo stimolo nocicettivo il 1° e il 6° giorno si osserva una riduzione della differenza tra le latenze statisticamente significativa il 6° giorno rispetto al 1° * indica $p < 0,05$ *Tukey post hoc*

4.6 ANALISI MOLECOLARE TRAMITE SDS-PAGE

Gli esperimenti condotti con inibitore della sintesi proteica hanno indicato che per il passaggio da apprendimento a breve termine ad apprendimento a lungo termine è necessaria la sintesi di proteine. Allo scopo di individuare le proteine coinvolte, è stato ottenuto preparati da sottoporre ad analisi molecolare tramite SDS-PAGE. A tale scopo sono state sonicate e poi centrifugate le catene nervose di animali di controllo e sensitizzati LT e sono stati ottenuti un *pellet* e un surnatante; dopo quantizzazione con spettrofotometro del contenuto proteico, è stata effettuata una separazione su gel monodimensionale delle proteine presenti sia nel *pellet* che nel surnatante. Si è potuta così confrontare la variazione dell'espressione proteica tra animali sensitizzati LT e di controllo (Fig 19). Tre gel ottenuti da 3 estrazioni diverse sono stati scannerizzati tramite il sistema di analisi dell'immagine UVP Image Store 5000. Il volume delle bande (espresso come unità di intensità x mm²) è stato misurato tramite programma *Quantity One Software* (Bio-Rad, Milano, Italia). Per quantificare l'espressione delle proteine sono state calcolate le differenze tra i volumi delle bande.

Dall'analisi statistica, effettuata tramite *Unpaired t test*, è risultato che le bande ottenute da *pellet* e surnatante di omogenato di animali sensitizzati LT (Fig 19) sono significativamente maggiori rispetto alle bande ottenute da *pellet* e surnatante di omogenato di animali di controllo: banda 1 ($t = 527,3$; $p < 0,0001$); banda 2 ($t = 105,8$; $p < 0,0001$); banda 3 ($t = 694,7$; $p < 0,0001$); banda 4 ($t = 308,9$; $p < 0,0001$)

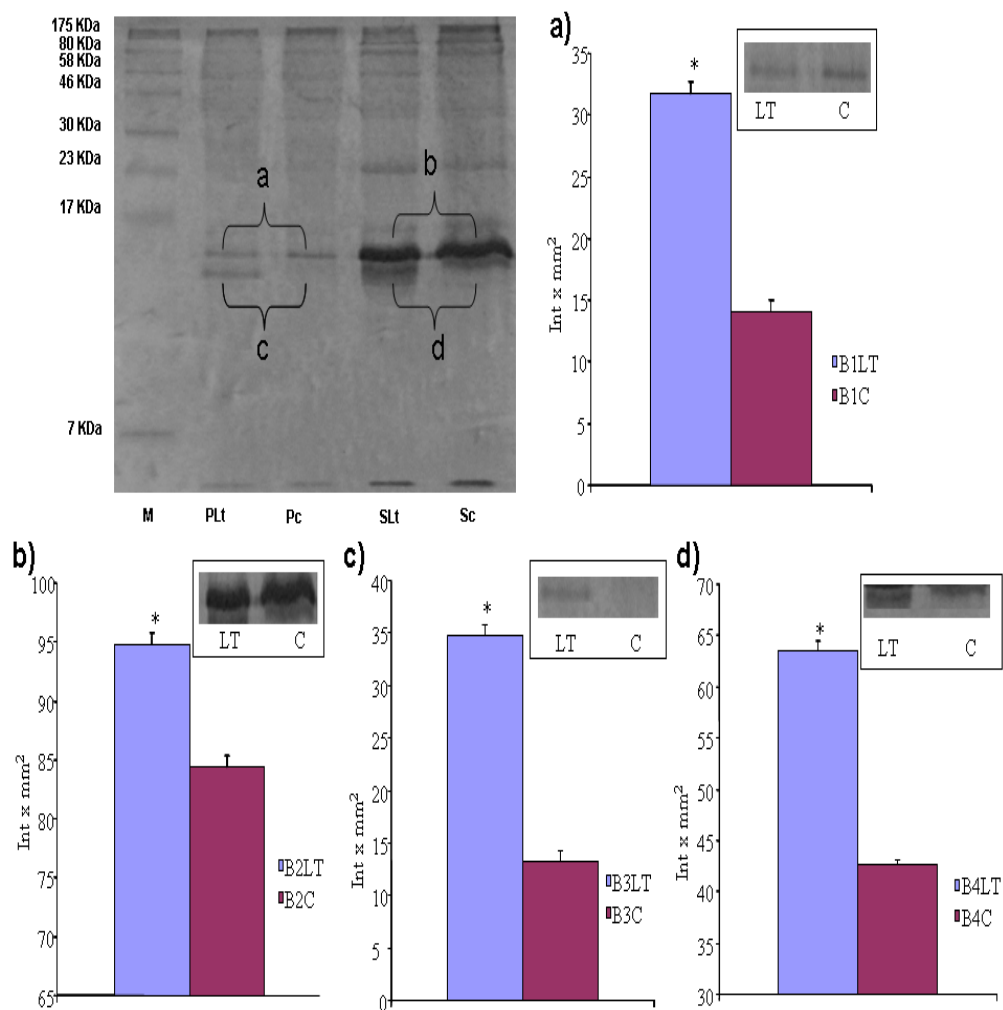


Fig. 19: Analisi molecolare tramite SDS-PAGE. Gel monodimensionale che riporta i profili proteici delle varie frazioni. M = marker, PLt = pellet animali sensitizzati LT, Pc = pellet dei controlli, SLt = surnatante animali sensitizzati LT, Sc = surnatante controlli. **a), b), c), d):** L'analisi dei volumi delle bande corrispondenti a proteine di diverso peso molecolare ha mostrato che c'è una differenza significativa fra campioni ottenuti da animali sensitizzati LT e di controllo. * indica $p < 0,0001$, *Unpaired t test*

5. DISCUSSIONE

Gli studi condotti utilizzando gli invertebrati come modelli sperimentali hanno permesso di ottenere molte informazioni sui meccanismi cellulari e molecolari alla base dell'apprendimento e della memoria.

I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi forniscono un ulteriore contributo allo studio dei meccanismi neurobiologici e molecolari alla base della memoria non associativa a lungo termine.

Il modello animale utilizzato, la sanguisuga *H. medicinalis*, ci ha permesso di effettuare studi comportamentali e biologico molecolari grazie alla sua semplicità nell'organizzazione anatomica che la rende facilmente accessibile alla sperimentazione.

Studi precedentemente condotti avevano già chiarito molti degli aspetti dell'apprendimento a breve termine in *H. medicinalis*, dimostrando ad esempio che le modificazioni alla base della sensitizzazione sono indotte da 5HT, neurotrasmettitore endogeno che, agendo tramite il cAMP, porta all'attivazione di PKA e quindi alla fosforilazione di diverse proteine del sistema nervoso.

In questo lavoro di tesi sono stati messi a punto protocolli per l'induzione di forme di apprendimento non associativo LT.

È stata indotta abitudine LT ripetendo per 6 giorni consecutivi la sequenza di stimoli test non nocivi per l'animale applicati ad ITI costanti che, se fornita una sola volta, produce abitudine a BT. Se gli stimoli erano forniti ad ITI radom, non si otteneva ne' abitudine BT ne' abitudine LT, dimostrando che non è la

stimolazione elettrica ripetuta ad indurre abitudine LT ma un particolare protocollo che prevede stimoli a determinati intervalli costanti. La migliore curva di abitudine è stata ottenuta con ITI uguali ad 1 minuto.

Il fatto che per ottenere abitudine LT sia necessaria una cadenza temporale ben precisa induce a pensare che si debbano attivare dei meccanismi che hanno una determinata temporalità e che hanno bisogno di un certo periodo di induzione. Pertanto, è plausibile pensare che l'attivazione della sintesi di proteine *ex novo* possa essere implicata nel processo.

Per indurre sensitizzazione LT è risultato fondamentale fornire all'animale stimolazioni nocicettive ripetute. Infatti, all'animale sono state fornite quotidianamente 4 serie di 15 spazzolate per 6 giorni consecutivi per determinare un potenziamento della risposta allo stimolo test dopo stimolazione nocicettiva più cospicuo il 6° giorno rispetto al 1°. Pertanto, per l'istaurarsi di apprendimento non associativo LT è necessaria la presentazione persistente di uno stimolo costantemente ripetuto nel tempo.

Per capire a cosa fosse dovuto il consolidamento delle tracce mnemoniche nel nostro modello abbiamo inibito la sintesi proteica. Ciò è stato suggerito dagli studi riportati in letteratura, che mostrano come in vari modelli animali l'apprendimento LT venga compromesso dalla somministrazione di inibitori della sintesi proteica quali la cicloesimide e l'emetina (Wittstock et al., 1993; Pedreira et al., 1994; Agin et al., 2003).

Ad esempio, nella seppia *Sepia officinalis* è stata analizzata la dipendenza della memoria a lungo termine dalla sintesi *ex novo* di proteine attraverso l'utilizzo dell'inibitore cicloesimide. Le

seppie iniettate con cicloesimide (vedi Apprendimento LT) mostravano una compromissione nella ritenzione delle informazioni a lungo termine e questo deficit non poteva che essere imputato all'azione dell'inibitore in quanto gli animali non mostravano segni di disagio fisico ma non erano in grado di eseguire più il compito comportamentale al quale erano stati sottoposti (Agin et al., 2003).

Negli esperimenti condotti durante questo progetto di tesi le sanguisughe sono state iniettate con 100µl /g di peso corporeo di soluzione fisiologica contenente cicloesimide alla concentrazione di 10^{-3} M. Opportuni dosaggi proteici hanno dimostrato che a questa concentrazione, la cicloesimide induce nel sistema nervoso di sanguisughe trattate, l'inibizione della sintesi proteica approssimativamente del 69%. Si è scelta questa concentrazione in quanto porta ad una buona riduzione della sintesi proteica che però non interferisce con il mantenimento di buone condizioni dell'animale. Non è stata, infatti, riscontrata riduzione della motilità negli animali trattati od altre condizioni di sofferenza.

Nei nostri esperimenti, negli animali trattati con inibitori e sottoposti a sessioni di abitudine LT è stato riscontrato un decremento della risposta sia il primo che il sesto giorno e le risposte registrate durante la sequenza di stimolazione nei due giorni non si discostavano significativamente tra loro dimostrando che, il sesto giorno, non era avvenuta abitudine LT.

Animali sensitizzati LT e iniettati con cicloesimide 10^{-3} M hanno mostrato sensitizzazione BT il primo giorno, mentre il sesto giorno le risposte ai 3 stimoli test successivi alla stimolazione nocicettiva non differivano in maniera statisticamente

significativa da Lm, dimostrando che non solo non era avvenuta sensitizzazione LT, ma c'era stata compromissione anche di sensitizzazione BT. Inoltre, le latenze medie registrate nei due giorni erano del tutto sovrapponibili, indicando che, la risposta basale dell'animale non era stata pregiudicata dall'iniezione dell'inibitore.

Il fatto che l'iniezione di cicloesimide compromettesse l'instaurarsi di abitudine LT e sensitizzazione LT ma anche di sensitizzazione BT suggerisce che alla base di queste due forme di apprendimento a lungo termine esistano meccanismi molecolari diversi.

Il passo successivo è individuare quali proteine siano coinvolte in queste due forme di memoria a lungo termine.

Nella sensitizzazione LT, in *Aplysia* sono state identificate alcune proteine che vengono sintetizzate durante il processo a lungo termine (Barzilai et al., 1992; Hu et al., 1993; Noel et al., 1993). I primi studi hanno individuato nella clatrina e nella tubulina, la cui sintesi aumenta precocemente nell'istaurarsi della sensitizzazione LT, e in quattro molecole di adesione cellulare (D1, D2, D3 e D4) riferite al complesso NCAM (*neural cell adhesion molecule*), il cui livello di espressione invece diminuisce, alcune delle proteine coinvolte nella sensitizzazione LT. Queste proteine sono responsabili dei cambiamenti strutturali che si verificano nelle fasi iniziali dell'apprendimento LT (Barzilai et al., 1989). Le molecole di adesione cellulare D1-D4, complessivamente denominate apCAM, mostrano un'elevatissima omologia con le NCAM dei vertebrati e la

Fasciciclina II di *Drosophila melanogaster* (Mayford et al., 1992).

Studi più recenti hanno evidenziato un ruolo fondamentale della actina 43 kDa (Noel et al., 1993), proteina coinvolta nel trasporto assonale, della Proteina 1 simile alla calmodulina (CaM) 17 kDa implicata nei processi di segnalazione intracellulari e della fosfoglicerato chinasi (PGK) 43,670 kDa (Zwartjes et al., 1998).

Nel nostro modello di sensitizzazione LT abbiamo proceduto con analisi molecolare condotta attraverso elettroforesi monodimensionale SDS-PAGE. Catene nervose di animali sperimentali e di controllo sono state sonicate in soluzione fisiologica e centrifugate. Dalla centrifugazione si è ottenuta una separazione fisica in pellet e surnatante e le proteine presenti sono state quantificate tramite spettrofotometro.

Tramite un'indagine preliminare abbiamo individuato proteine maggiormente espresse in omogenato ricavato da animali sensitizzati LT rispetto a quello ricavato da animali di controllo. Le proteine da noi individuate sono a basso peso molecolare (circa 17 kDa). Al momento non siamo in grado di definire le proteine coinvolte nel passaggio da sensitizzazione BT a LT, ma i risultati da noi ottenuti sembrano concordare con quanto riportato in letteratura. Ad esempio, come sopra citato, in *Aplysia californica* è stata individuata la Proteina 1 (CaM- simile) dal peso molecolare di 17 kDa. CaM è una proteina altamente conservata (Kawasaki et al., 1998) ed è essenziale per la sopravvivenza in tutti gli eucarioti, inclusi i lieviti (Geiger et al., 1991) e quindi potrebbe essere una proteina candidata ad essere espressa anche nel nostro modello sperimentale.

Inoltre, nel sistema nervoso, a livello presinaptico, la CaM può comportarsi come un sensore per il rilascio del Ca^{2+} (DeLorenzo, 1981) o modularne il rilascio (Chamberlain et al., 1995; Junge et al., 2004). La maggior parte del rilascio del trasmettitore è attivato dal legame Ca^{2+} - Sinaptogamina (Maximou & Südhof, 2005) mentre la CaM può comportarsi come un ausiliare del Ca^{2+} nel rilascio del trasmettitore non mediato dalla sinaptogamina (Sun et al., 2007). Inoltre può regolare il riempimento del pool di vescicole di neurotrasmettitore prontamente rilasciabili (Sakaba & Neher, 2001) e/ o modulare il rilascio presinaptico attivando la chinasi calmodulina dipendente (CaM- K) $\text{II}\alpha$ e $\text{II}\beta$ (Dick et al., 2008). Infine, controlla la funzione dei canali Ca^{2+} pre e post sinaptici (Dick et al., 2008) che mediano la plasticità post sinaptica LT attivando la CaM-K $\text{II}\alpha$ e la calcineurina (Xia & Storm, 2005) modulando l'espressione genica neurale (Greer & Greemberg, 2008). È quindi probabile che CaM giochi un ruolo fondamentale nei processi di apprendimento a lungo termine in molti animali lungo la scala filogenetica.

Ulteriori indagini che si dovranno avvalere di tecniche di proteomica potranno confermare nel nostro modello la natura e il ruolo delle proteine necessarie al passaggio da apprendimento a breve termine ad apprendimento a lungo termine.

BIBLIOGRAFIA

- ABEL T & KANDEL E (1998) “Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage”. *Brain Res Brain Res Rev.* 26(2-3):360-78.
- AGIN V, CHICHERY R, MAUBERT E, CHICHERY MP (2003) “Time-dependent effects of cycloheximide on long-term memory in the cuttlefish”. *Pharmacol Biochem Behav.* 75(1):141-6.
- BAILEY CH, CHEN M, KELLER F, KANDEL ER. (1992) “Serotonin-mediated endocytosis of apCAM: an early step of learning-related synaptic growth in *Aplysia*”. *Science.* 256(5057):645-9.
- BAYLOR DA & NICHOLLS JG (1969) “Chemical and electrical synaptic connexions between cutaneous mechanoreceptor neurons in the central nervous system of the leech”. *J Physiol.* 203:591-609
- BAGNOLI P, BRUNELLI M, MAGNI F. (1973) “Afferent connections to the fast conduction pathway in the central nervous system of the leech *Hirudo medicinalis*”. *Arch Ital Biol.* 111(1):58-75.
- BAGNOLI P, BRUNELLI M, MAGNI F, PELLEGRINO M (1975) “The neuron of the fast conducting system in *H. medicinalis*: identification and synaptic connections with primary afferent neurons”. *Arch. Ital. Biol.* 113:21-43.

- BARZILAI A, KENNEDY TE, SWEATT JD, KANDEL ER (1989) "5-HT modulates protein synthesis and the expression of specific proteins during long-term facilitation in Aplysia sensory neurons". *Neuron*. 2(6):1577-86.
- BARZILAI A, KENNEDY TE, SWEATT JD & KANDEL E (1992) "Long-term sensitization training in Aplysia leads to an increase in calreticulin, a major presynaptic calcium-binding protein". *Neuron*. 9(6):1013-24.
- BAXTER DA & BYRNE JH (1990) "Differential effects of cAMP and serotonin on membrane current, action-potential duration, and excitability in somata of pleural sensory neurons of Aplysia". *J Neurophysiol*. 64(3):978-90.
- BOULIS MN & SAHLEY CL (1988) "A behavioral analysis of habituation and sensitization of shortening in the semi-intact leech". *CLJ Neurosci*. 8(12):4621-7.
- BRODFUEHRER PD & FRIESEN WO (1986b) "Initiation of swimming activity by trigger neurons in the leech subesophageal ganglion. I. Output connections of Tr1 and Tr2" *J Comp Physiol A*. 159(4):489-502.
- BRODFUEHRER PD & FRIESEN WO (1986c) "Initiation of swimming activity by trigger neurons in the leech subesophageal ganglion. II. Role of segmental swim-initiating interneurons". *J. Comp. Physiol. (A)*. 159: 503-510.
- BRODFUEHRER PD & FRIESEN WO (1986d) "Initiation of swimming activity by trigger neurons in the leech subesophageal ganglion. III. Sensory output to Tr1 and Tr2". *J. Comp. Physiol (A)*. 159:511-519.

- BRODFUEHRER PD & THOROGOOD MS (2001) “Identified neurons and leech swimming behaviour”. *Prog Neurobiol.* 63(4):371-81.

- BYRNE JH & KANDEL ER (1996) “Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence”. *Neurosci.* 16(2):425-35.

- BYRNE JH (1994) “Evaluation of the neurobehavioral functioning of patients before, during, and after bone marrow transplantation.” *J Clin Oncol.* 12(4):820-6.

- BURRELL BD & SAHLEY CL (2005) “Serotonin mediates learning-induced potentiation of excitability”. *CLJ Neurophysiol.* 94(6):4002-10.

- CACCIATORE TW, ROZENSHTEYN R, KRISTAN WB JR.(2000) “Kinematics and modeling of leech crawling: evidence for an oscillatory behavior produced by propagating waves of excitation”. *J Neurosci.* 15;20(4):1643-55.

- CHAMBERLAIN LH, ROTH D, MORGAN A, BURGOYNE RD (1995) “Distinct effects of alpha-SNAP, 14-3-3 proteins, and calmodulin on priming and triggering of regulated exocytosis”. *J Cell Biol.* 130(5):1063-70.

- CHANG DJ, LI XC, LEE YS, KIM HK, KIM US, CHO NJ, LO X, WEISS KR, KANDEL ER, KAANG BK (2000) “Activation of a heterologously expressed octopamine receptor coupled only to adenylyl cyclase produces all the features of presynaptic facilitation in *Aplysia* sensory neurons” *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(4):1829-34.

- COLOMBAIONI L & BRUNELLI M (1988) "Neurotransmitter-induced modulation of an electrotonic synapse in the CNS of *Hirudo medicinalis*" *Exp Biol.* 47(3):139-44.

- DEBSKY EA & FRIESEN WO (1985) "Habituation of swimming activity in the medicinal leech". *J Exp Biol.* 116:169-88.

- DELORENZO RJ (1981) "The calmodulin hypothesis of neurotransmission. *Cell Calcium*".2(4):365-85.

- DICK IE, TADROSS MR, LIANG H, TAY LH, YANG W, YUE DT (2008) "A modular switch for spatial Ca²⁺ selectivity in the calmodulin regulation of CaV channels". *Nature.* 451(7180):830-4.

- FRIESEN WO (1989) "Modulation of swimming activity in the medicinal leech by serotonin and octopamine". *Comp Biochem Physiol C.* 94(1):295-302.

- FRIESEN WO & CANG J (2001) "Sensory modification of leech swimming: interactions between ventral stretch receptors and swim-related neurons". *J Comp Physiol A.* 187(7):569-79.

- FRIESEN WO & KRISTAN WB (2007) "Leech locomotion: swimming, crawling, and decisions". *Curr Opin Neurobiol.* 17(6):704-11.

- GEIGER B, VOLBERG T, DROR R, ZICK Y (1991) “Modulation of intercellular adherens-type junctions and tyrosine phosphorylation of their components in RSV-transformed cultured chick lens cells”. *Cell Regul.* 2(2):105-20.
- GREER PL & GREENBERG ME (2008) “From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function”. *Neuron.* 59(6):846-60.
- GROVES PM, LEE D, THOMPSON RF “Effects of stimulus frequency and intensity on habituation and sensitization in acute spinal cat”. *Physiol. Behav.* 4:383-388.
- GROVES PM & THOMPSON RF(1970) “Habituation: a dual process theory”. *Psych. Rev.* 77: 419-450.
- HU Y, BARZILAI A, CHEN M, BAILEY CH, KANDEL ER (1993) “5-HT and cAMP induce the formation of coated pits and vesicles and increase the expression of clathrin light chain in sensory neurons of aplysia”. *Neuron.*10(5):921-9.
- JUNGE HJ, RHEE JS, JAHN O, VAROQUEAUX F, SPIESS J, WAXHAM MN, ROSENMUND C, BROSE N (2004) “Calmodulin and Munc13 form a Ca²⁺ sensor/effector complex that controls short-term synaptic plasticity”. *Cell.* 118(3):389-401.
- KAANG BK, KANDEL ER, GRANT SG (1993) “Activation of cAMP-responsive genes by stimuli that produce long-term facilitation in Aplysia sensory neurons” *Neuron.* 10(3):427-35.

- KANDEL ER & SCHWARTZ JH(1982) “Molecular biology of learning: modulation of transmitter release”. *Science*. 218(4571):433-43.
- KAWASAKI H, NAKAYAMA S, KRETSINGER RH (1998) "Classification and evolution of EF-hand proteins". *Biometals*. 11(4):277-95.
- KRISTAN WB JR, CALABRESE RL, FRIESEN WO. (2005) "Neuronal control of leech behaviour". *Prog Neurobiol*. 76(5):279-327.
- KRISTAN WB JR, EISENHART FJ, JOHNSON LA, FRENCH KA. (2000) “Development of neuronal circuits and behaviors in the medicinal leech”. *Brain Res Bull*.53(5):561-70.
- KRISTAN WB JR, WEEKS JC. (1983) “Neurons controlling the initiation, generation and modulation of leech swimming”. *Symp Soc Exp Biol*. 37:243-60.
- LEAKE LD & KOUBANAKIS M(1995) “Central and peripheral 5-HT receptors in the leech (*Hirudo medicinalis*) redefined”. *MGen Pharmacol*.26(8):1709-17.
- LENT CM. (1973) “Retzius cells: neuroeffectors controlling mucus release by the leech”. *Science*. 179(74):693-6.
- LENT CM, ZUDEL D, FREEDMAN E, GROOME JR (1991) “Serotonin in the leech central nervous system: anatomical correlates and behavioural effects”. *J. Comp. Physiol*. 168:191-200.

- LOCKERY SR & KRISTAN WB (1985) “Neural correlates of habituation and sensitization in the leech”. Soc. Neurosci. Abstr. 11:794.
- LOCKERY SR & KRISTAN WB (1990) “Distributed processing of sensory information in the leech. Input-output of the local bending reflex”. J. Neurosci. 10:1811-1815.
- LOCKERY SR & KRISTAN WB (1991) “Two forms of sensitization of the local bending reflex of the medicinal leech”. Behav. Neurosci. 99:333-341.
- LOCKERY SR, RAWLINS JN, GRAY JA.. (1985) “Habituation of the shortening reflex in the medicinal leech”. Behav Neurosci. 99(2):333-41.
- MACAGNO ER (1980) “Number and distribution of neurons in leech segmental ganglia”. Comp Neurol. 190(2):283-302.
- MAYFORD M, BARZILAI A, KELLER F, SCHACHER S, KANDEL ER” (1992) “Modulation of an NCAM-related adhesion molecule with long-term synaptic plasticity in Aplysia”. Science. 256(5057):638-44.
- MACKEY S, KANDEL ER, HAWKINS RD (1989) “Identified serotonergic neurons LCB1 and RCB1 in the cerebral ganglia of Aplysia produce presynaptic facilitation of siphon sensory neurons”. J Neurosci. 9(12):4227-35.

- MAGNI F & PELLEGRINO M (1978) “Patterns of activity and the effects of activation of the fast conducting system on the behaviour of unrestrained leeches”. *MJ Exp Biol.* 76:123-35.
- MAXIMOV A & SÜDHOF TC (2005) “Autonomous function of synaptotagmin 1 in triggering synchronous release independent of asynchronous release. *Neuron* 48:547–554
- MCGAUGH JL (1966) “Time-dependent processes in memory storage”. *Science.* 153(742):1351-8.
- MULLER KJ & MCMAHAN WF (1976) “The shapes of sensory and motor neurons and the distribution of their synapses in ganglia of the leech: a study using intracellular injection of horseradish peroxidase”. *Proc. Royal Soc. B.* 194:481-499.
- MULLER KJ, SCOTT SA (1981) “Transmission at a 'direct' electrical connexion mediated by an interneurone in the leech”. *J Physiol.* 311:565-83.
- NOEL F, NUÑEZ-REGUEIRO M, COOK R, BYRNE JH, ESKIN A. (1993) “Long-term changes in synthesis of intermediate filament protein, actin and other proteins in pleural sensory neurons of *Aplysia* produced by an in vitro analogue of sensitization training”. *Brain Res Mol Brain Res.* 19(3):203-10.
- NUSBAM MP & KRISTAN WB (1986) “Swim initiation in the leech by serotonin-containing interneurons, cells 21 and 61”. *J Exp Biol.* 122:277-302.

- O'GARA BA & FRIESEN WO (1995) "Termination of leech swimming activity by a previously identified swim trigger neuron". J Comp Physiol A. 177(5):627-36.
- PAVLOV I (1927) "Conditioning Reflexes: An investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex" G.V. Anrep (trans.) London: Oxford University Press
- PEDREIRA, M. E., B. DIMANT, D. TOMSIC, L. A. QUESADA-ALLUE AND H. MALDONADO (1993) "Cycloheximide Inhibits Context Memory and Long-Term Habituation in the Crab *Chasmagnathus*" Pharmacol Biochem Behav. 52(2):385-395, 1995.
- ROSENZWEIG MR, BENNETT EL, COLOMBO PJ, LEE DW, SERRANO PA (1993) "Short-term, intermediate-term, and long-term memories" Behav Brain Res. 57(2):193-8.
- SAWYER (1986) "Leech biology and behaviour". Oxford Science Publications- Clarendon Press Vol I
- SAHLEY C (1995) "What we have learned from the study of learning in the leech". J Neurobiol. 27(3):434-45.
- SAHLEY CL & BURRELL BD (1998) "Generalization of habituation and intrinsic sensitization in the leech". Learn Mem. 5(6):405-19.
- SCURI R, MOZZACHIODI R, BRUNELLI M (2002) "Activity-dependent increase of the AHP amplitude in T sensory neurons of the leech". J Neurophysiol. 88(5):2490-500.

- SCURI R, MOZZACHIODI R, BRUNELLI M (2005) “ Role of calcium signalling and arachidonic acid metabolites in the activity- dependent increase of AHP amplitude in leech T sensory neurons”. J. Neurophysiol. 94:1066-1073.
- SHAW BK & KRISTAN WB (1999) “Relative roles of the S cell network and parallel interneuronal pathways in the whole-body shortening reflex of the medicinal leech”. J Neurophysiol. 82(3):1114-23.
- SILVA AJ, KOGAN JH, FRANKLAND PW, KIDA S. (1998) "CREB and memory". Annu Rev Neurosci. 21:127-48
- SKINNER CE (1938) “The behaviour of organisms: An Experimental Analysis” New York: Appleton- Century- Crofts.
- SQUIRE LR. (1992) “The organization and neural substrates of human memory”. Int J Neurol. 21-22:218-22.
- SQUIRE LR, KNOWLTON BJ, GLUCK MA (1994) “Probabilistic classification learning in amnesia”. Learn Mem. 1(2):106-20.
- STENT GS E KRISTAN Jr WR (1981) “Neuronal circuits generative of rhythmic movement”. In: “Neurobiology of the leech” pp. 113-146.
- STUART A (1970) “ Physiological and morphological properties of motoneurons in the central nervous system of the leech”. J. Neurophysiol. 72:1240-1259.

- SUN J, PANG ZP, QIN D, FAHIM AT, ADACHI R, SÜDHOF TC (2007). "A dual-Ca²⁺-sensor model for neurotransmitter release in a central synapse". *Nature*. 9;450(7170):676-82.

- THOROGOOD MS & BRODFUEHRER PD (1995). "The role of glutamate in swim initiation in the medicinal leech". *Invert Neurosci*. 1(3):223-33.

- VAN ESSEN DC (1973) "The contribution of membrane hyperpolarization to adaption and conduction block in sensory neurons of the leech". *J. Physiol*. 230:509-534.

- VAZQUEZ Y, MENDEZ B, TRUETA C, DE-MIGUEL FF (2009) "Summation of excitatory postsynaptic potentials in electrically-coupled neurones". *Neuroscience*. 163(1):202-12.

- WEEKS JC & KRISTAN JrWB (1978) "Initiation, maintenance and modulation of swimming in the medicinal leech by the activity of a single neuron". *J. Exp. Biol*. 77:71-88.

- WILLARD AL (1981) "Effects of serotonin on the generation of the motor program for swimming by the medicinal leech". *J Neurosci*. 1(9):936-44.

- WITTSTOCK S, KAATZ HH, MENZEL R (1993) "Inhibition of brain protein synthesis by cycloheximide does not affect formation of long-term memory in honeybees after olfactory conditioning". *J Neurosci*. 13(4):1379-86.

- XIA Z & STORM DR (2005) “The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity”. *Nat Rev Neurosci.* 6(4):267-76.
- ZACCARDI ML, GIOVANNA TRAINA, ENRICO CATALDO, MARCELLO BRUNELLI (2001) “Nonassociative learning in the leech *Hirudo medicinalis*” *Behav Brain Res.*126(1-2):81-92.
- ZACCARDI ML, GIOVANNA TRAINA, ENRICO CATALDO, MARCELLO BRUNELLI. (2004) “Sensitization and dishabituation of swim induction in the leech *Hirudo medicinalis*: role of serotonin and cyclic AMP”. *Behav. Brain Res.* 153:317-326.
- ZWARTJES RE, WEST H, HATTAR S, REN X, NOEL F, NUÑEZ-REGUEIRO M, MACPHEE K, HOMAYOUNI R, CROW MT, BYRNE JH, ESKIN A. (1998) “Identification of specific mRNAs affected by treatments producing long-term facilitation in *Aplysia*”. *Learn Mem.*4(6):478-95.
- ZHOU Y, WON J, KARLSSON MG, ZHOU M, ROGERSON T, BALAJI J, NEVE R, POIRAZI P, SILVA AJ (2009) “CREB regulates excitability and the allocation of memory to subsets of neurons in the amygdale”. *Nat Neurosci.* 12(11):1438-43.